

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Geschäftsführende Direktorin: Prof. Dr. Susanne Fuchs-Winkelmann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Funktionalisierung von PLLA-Nanofasern mittels integrinbindender RGD-Sequenzen im Rahmen des Tissue Engineering

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Sarah Kristin Bockelmann
aus Braunschweig
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 22.02.2017.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. M. Schofer

1.Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Bakowsky

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Einleitung	5
2.1	Therapie von Knochendefekten.....	5
2.2	Tissue Engineering (TE)	6
2.3	Humane mesenchymale Stammzellen – hMSC	7
2.4	Elektrospinnen	9
2.5	Poly(L-lactid)-Nanofasern und ihre Funktionalisierung	10
2.6	Biologische Aktivität von RGD-Sequenzen	12
2.7	Ziel der Arbeit	14
3	Material und Methoden.....	15
3.1	Material.....	15
3.1.1	Chemikalien.....	15
3.1.2	Geräte.....	17
3.2	Methoden	19
3.2.1	Gewinnung von hMSC	19
3.2.2	Kultivierung der hMSC	20
3.2.3	Kryokonservierung der hMSC.....	20
3.2.4	Durchführung der Zellversuche	21
3.2.5	FACSanalyse der hMSC.....	21
3.2.6	Immunfluoreszenz	22
3.2.7	Real-Time-PCR.....	23
3.2.8	Elektrospinnen und Fasercharakterisierung.....	25
3.2.9	Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-lRGD (s)	25
3.2.10	Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Emulsion – PLLA-cRGD (d).....	27
3.2.11	RGD-Kopplung mittels EDC und NHS.....	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-linRGD (s).....	29
4.1.1	Adhäsion der hMSC auf linRGD-haltigen und cRGD-haltigen Nanofasern.....	29
4.1.2	Matrixformation	31

4.2 cRGD-Inkorporation in PLLA-Nanofasern mittels Emulsion und Suspension – PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s)	34
4.2.1 Fasercharakterisierung.....	34
4.2.2 Adhäsion, Wachstum und Proliferation der hMSC auf Nanofasern.....	37
4.2.3 Matrixformation	38
4.3 cRGD-Oberflächenkopplung mittels Plasmabehandlung von PLLA-Nanofasern.....	41
4.3.1 Fasercharakterisierung.....	41
4.3.2 Wachstum und Proliferation von hMSC auf plasmabehandelten Nanofasern.....	46
4.3.3 Matrixformation	48
5 Diskussion.....	52
5.1 Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-linRGD (s).....	53
5.2 cRGD-Inkorporation in PLLA-Nanofasern mittels Emulsion und Suspension – PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s)	55
5.3 cRGD-Oberflächenkopplung mittels Plasmabehandlung von PLLA-Nanofasern.....	57
5.4 Ausblick	61
6 Zusammenfassung	62
7 Literaturverzeichnis.....	66
8 Abbildungsverzeichnis	71
9 Anhang	74

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	bone morphogenetic protein
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COL I	Kollagen I
Cy2 / Cy3	Cyanine 2/3
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dT	Desoxythymidin
EDC	1-Ethyl-3 (3dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
FITCS	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hMPC	humane mesenchymale Progenitorzellen

Abkürzung	Bedeutung
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
mM	MilliMol
ng	Nanogramm
μM	MikroMol
OC	Osteocalcin
OIM	Osteogenesis Induction Medium
PBS	Phosphat Bufferd Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Poly(ethyleneglycol)
PEM	Polyelectrolyte-multilayer
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PLLA	Poly(L-lactid)
PMMA	Polymethylmetacrylat
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RIA	Reamer/Irrigator/Aspirator
RNA	Ribonukleinsäure
rt-PCR	Real-Time-PCR
S.	Seite
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TE	Tissue Engineering
°C	Grad Celsius
UpM	Umdrehungen pro Minute
Wt%	Gewichtsprozent

2 Einleitung

2.1 Therapie von Knochendefekten

Im klinischen Alltag stellt die Versorgung von Knochendefekten, welche durch Traumata, Degeneration oder auch Tumore verursacht sein können, eine große Herausforderung dar. Die standardisierte Behandlung von besonders großen Defekten liegt in der Knochentransplantation, welche sowohl autogen als auch allogene erfolgen kann. Dabei beschränkt vor allem die Verfügbarkeit des Materials die Defektfüllung. Bei der autogenen Transplantation stellt dies einen entscheidenden Punkt dar, wie auch die Tatsache, dass ein zusätzlicher Entnahmeeingriff (beispielsweise die Entnahme eines Beckenkammspanes oder Spongiosa aus dem patienteneigenen Beckenkamm) notwendig ist, welcher mit nachfolgenden Komplikationen oder Morbiditäten verbunden sein kann (Ahlmann et al. 2002). Bei allogenen Transplantationen kann es nach Transplantation zur immunologischen Abstoßungsreaktion gegen das körperfremde Material kommen. Hier besteht ebenfalls, wie bei allen Formen der Transplantation, das Risiko der Übertragung von Erkrankungen des Spenders.

Eine weitere Therapie, lange Knochendefekte zu überbrücken, stellt der Knochensegmenttransport nach Ilizarov, auch Kallusdistraktion genannt, dar (Do et al. 1992). Ein vitales abgetrenntes Knochenfragment wird hierbei z.B. über einen Verriegelungsnagel mit einem Transport-Fixateur externe 1mm/Tag weitertransportiert. Hinter diesem Fragment entsteht der Kallus, der sich im Verlauf in Ersatzknochen umwandelt. Möglich sind Distraktionen auch mit einem Fixateur externe und über ein Seilzug-System. Mit dieser Methode lassen sich an langen Röhrenknochen Abschnitte von bis zu 15 cm überbrücken. Diese Methode ist mit mehrfachen operativen Eingriffen verbunden. Durch den Fixateur externe ergibt sich das Risiko von Infektionen über die intramedullären Pins (Ochman et al. 2006). Bei lange bestehendem Fixateur externe limitieren vor allem die Lockerung der Pins und auch die Transfixation der Weichteile, welche wiederum die Gelenkfunktionen

beeinträchtigen können, die Anwendung (Höntzsch, Weise and Weller 2000). Ein weiteres Verfahren zur Behandlung großer Defekte stellt das Masqueletverfahren dar. Hier wird Spongiosa des Patienten im Femurschaft entnommen, das sogenannte RIA Verfahren (Reamer/Irrigator/Aspirator-Verfahren) und in den Knochendefekt nach einer Spacerbehandlung mit gebildeter Neomembran eingesetzt (Flamans et al. 2010). Auch hier liegt die Limitierung in der Verfügbarkeit der vorhandenen Eigenspongiosa zur Abheilung des Defektes.

Der Versuch synthetische Ersatzmaterialien zu entwickeln wurde in den vergangenen Jahren aufgrund des hohen Bedarfs stark vorangetrieben. Es zeigte sich jedoch, dass die Versorgung von größeren Defekten mit den eben genannten Verfahren wenig geeignet ist (Dallari et al. 2006, Dallari et al. 2007). Auch synthetische Ersatzmaterialien können Abstoßungsreaktionen auslösen, so dass das Implantatmaterial wieder entfernt werden muss (Gerlach and Niehues 2007).

Deshalb gewinnt das Tissue Engineering als Möglichkeit der biologischen Defektfüllung immer mehr an Bedeutung als Aussicht für eine erfolgsversprechende Behandlung.

2.2 Tissue Engineering (TE)

Das Tissue Engineering beruht auf einer Zusammenarbeit von Zellbiologie, Biomaterialentwicklung, Zellkulturtechnik und Bioverfahrenstechnik.

Unter diesem Verfahren versteht man die Züchtung von vitalen Organgeweben unter Laborbedingungen (in vitro), welche im Anschluss dem entnommenen Organismus reimplantiert werden können.

Die National Foundation definierte 1987: „Gewebetechnologie stellt die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Technik und Naturwissenschaften in Richtung grundlegenden Verständnisses von Struktur- und Funktionsbeziehung normaler und pathologischer veränderter Gewebe und die Entwicklung von biologischen Substituten dar, um Gewebefunktionen

wiederherzustellen, aufrecht zu erhalten oder zu verbessern“ (Definition der National Foundation).

Die Züchtung des Gewebes erfolgt auf so genannten „Scaffolds“ - künstliche Zellgerüste aus unterschiedlichsten Materialien mit verschiedenen Oberflächenstrukturen – auf denen die Zellen ausgesiedelt und *in vitro* kultiviert werden. In der Medizin wird das TE in vielen Fachbereichen seit mehreren Jahrzehnten verwendet. Bereits in den Achtziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts beobachteten Wolter und Meyer das Wachstum von epithelähnlichen Strukturen auf der Oberfläche von Augen- bzw. Hornhautprothesen aus Polymethylmetacrylat (PMMA) (Wolter und Meyer 1984). Auch in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie wird das TE für die Herstellung von Herzklappen, Gefäßen oder Myokard verwendet (Sodian und Hetzer 2003). In der Dermatologie gibt es großen Bedarf zur Herstellung von Hautimplantaten mittels TE (Naughton, Tolbert und Grillo 1995). In der Orthopädie und Unfallchirurgie ist das TE relativ weit entwickelt. Genutzt wird es besonders für die Herstellung von Knorpel, Knochen und Bändern, Gewebe, deren Eigenheilung stark begrenzt oder bei ausgeprägten Verletzungen und Weichteilschäden nicht möglich ist. Der Knochenersatz dient zur Defektfüllung großer Knochendefekte und verspricht insbesondere Lösungen für die Tumorchirurgie, in der zum aktuellen Zeitpunkt oftmals die Amputation bei nicht füllbaren Defekten erfolgen muss. Zur Gewebezüchtung dienen hier unterschiedliche Zelltypen. Häufig verwendet werden Osteoblasten oder humane mesenchymale Progenitorzellen (Kim et al. 2010, Li et al. 2005).

2.3 Humane mesenchymale Stammzellen – hMSC

Im Knochenmark liegen drei verschiedene Zellsysteme vor: das endotheliale, das hämatopoetische und das stromale Zellsystem. Das stromale Zellsystem wurde erstmals von Owen im Jahre 1985 beschrieben (Owen 1985). Ausgangspunkt sind hier pluripotente Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen zu proliferieren und sich zu teilen. Aus diesen gehen mesenchymale Progenitorzellen hervor (hMPC oder hMSC). Diese besitzen wiederum die

Fähigkeit zu unterschiedlichen Zelltypen auszudifferenzieren. Sie sind fähig Fett, Muskel, Knochen, Knorpel, Sehnen, neurale Zellen oder auch das hämatopoetische Stroma auszubilden (Caplan 1994, Dennis et al. 1999, Majumdar et al. 1998). Welche Linie die Progenitorzelle einschlägt bzw. zu welchem Typ sie sich ausdifferenziert unterliegt Kaskaden und Einflüssen des umliegenden Gewebes (parakriner Effekt) und einem autokrinen Effekt, das heißt von der Zelle selbst ausgehenden Einflüssen. Die Fähigkeit dieser Zellen liegt nicht nur darin, sich zu differenzieren, sondern ebenfalls zu proliferieren (Friedenstein, Gorskaja und Kulagina 1976, Conget und Minguell 1999). Der Karyotyp und die Telomerase-Aktivität der Ausgangszelle bleibt dabei bestehen (Pittenger et al. 1999).

Um die mesenchymalen Progenitorzellen zu phänotypisieren wurde sich die Antigen-Antikörper-Bindung monoklonaler Antikörpern auf der Oberfläche zu Nutze gemacht (Bruder et al. 1997). Dabei entdeckte man, dass sich Strukturen von mesenchymalen, endothelialen, epithelialen und auch muskulären Zellen finden ließen. Jedoch fand man keine typischen Oberflächen-Antigene wie CD 45, CD 34 oder CD 14, welche von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden (Conget and Minguell 1999, Pittenger et al. 1999).

Bei weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MSC zu osteogener Differenzierung neigen (Pittenger et al. 1999, Conget und Minguell 1999, Fickert, Fiedler und Brenner 2004). Zurückzuführen ist dies auf das Oberflächen-Antigen CD 44, welches auf Chondrozyten exprimiert wird und unter anderem als Rezeptor für Hyaluron und Osteopontin fungiert. Hyaluron und Osteopontin stellen wichtige Faktoren in der Entwicklung und Organisation der extrazellulären Matrix des Knochens und des Knochenmarks dar (Minguell 1993). In der Zellkultur können hMSC unter Zugabe von osteoinduktivem Medium zur Differenzierung angeregt werden. Das Medium enthält zum Standardmedium Ascorbinsäure, Dexamethason und Beta-Glycerolphosphat (Hou et al. 2007).

2.4 Elektrospinnen

Das Elektrospinnen ist ein geeignetes Verfahren zur Herstellung dünner Fasern aus Polymeren (Greiner und Wendorff 2007). Erste Durchführungen des Elektrospinnens fanden bereits 1929 statt und wurden von Formhals zum Patent angemeldet (Valizadeh et al. 2014). Lange Zeit geriet das Verfahren in Vergessenheit, bevor sich Reneker in den letzten Jahren wieder dieser Methode bediente (Koombhongse, Liu und Reneker 2001).

Beim Elektrospinnen wird über eine Kapillare, welche mit einer Elektrode verbunden ist, die Polymerlösung einem elektrischen Feld von ca. einem kV/cm ausgesetzt. Die Gegenelektrode befindet sich im Abstand von wenigen Zentimetern dazu. In diesem Feld wird der aus der Kapillare hängende Tropfen konusartig deformiert bis er schließlich einen elektrisch geladenen Strahl ausbildet, der zur Gegenelektrode beschleunigt wird. Auf dieser entsteht das gesponnene Fasernetz (Boudriot et al. 2006).

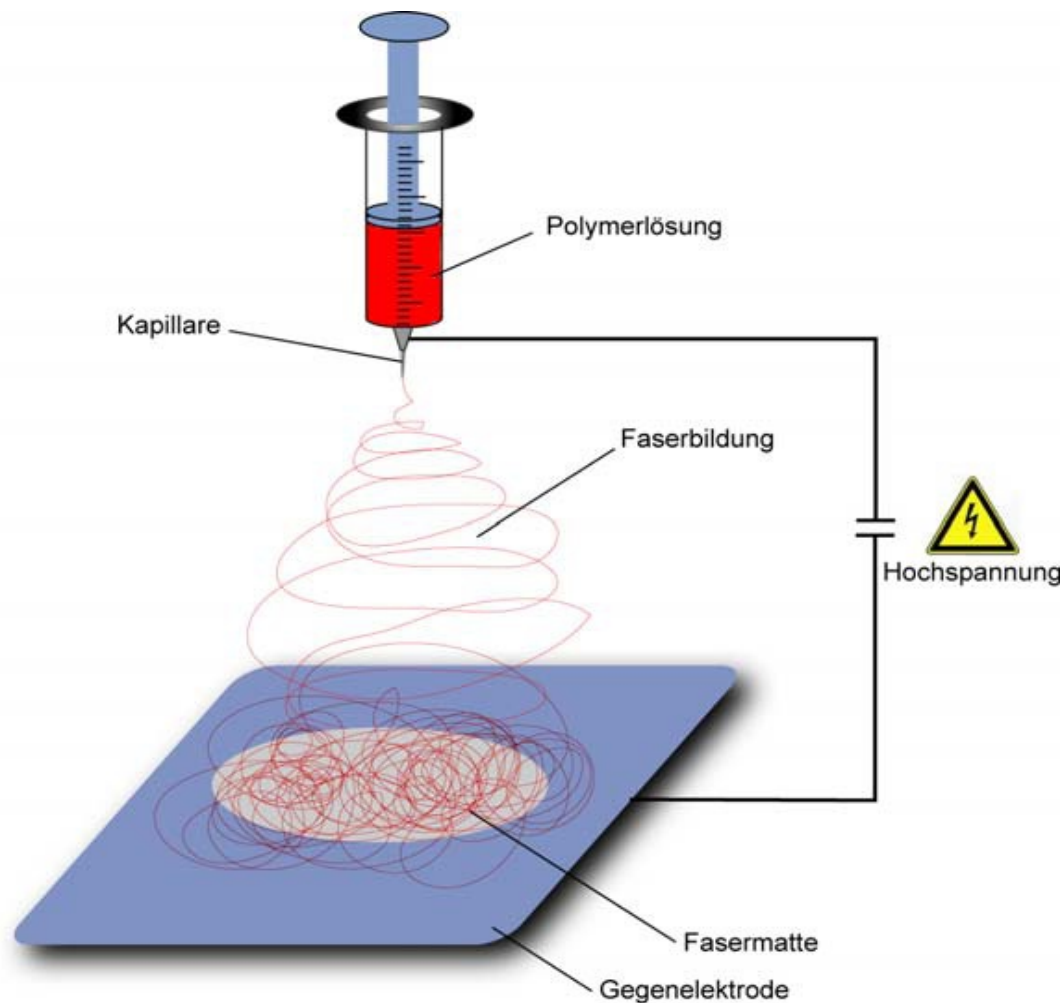


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Elekterspinnapparatur (Dersch 2006)

Der Faserdurchmesser beträgt bei diesem Verfahren einige zehn Nanometer bis hin zu wenigen Mikrometern (Dersch 2006). Als dreidimensionales Netzwerk stellen die Nanofasern das Grundgerüst der extrazellulären Zellmatrix.

2.5 Poly(L-lactid)-Nanofasern und ihre Funktionalisierung

Die Polymerlösung kann aus unterschiedlichen Substraten bestehen. Verwendet werden im Rahmen des Tissue Engineering beispielsweise Polyurethane, Polycarbonat, Polystyrol, Poly(styrol-butadienstyrol)-Triblock-Copolymer, Poly(ethylenoxid), Poly(caprolacton), Poly(L-lactid-co- ϵ -caprolacton), Celluloseacetat, Kollagen (Schofer et al. 2009b), Poly(L-lactid)

(Schofer et al. 2008) und Nylon 6 (Liu et al. 2007). In den vergangenen Jahren beschäftigten sich viele Arbeitsgruppen mit der Fragestellung, welches Polymer die besten Voraussetzungen für das Tissue Engineering liefert. Naheliegend war die Möglichkeit Scaffolds aus Kollagen zu verwenden, welches Bestandteil der biologischen Zellmatrix ist. Ebenfalls häufig verwendet wurde das Poly(L-lactid) (Hu et al. 2009, Inui et al. 2009, Prabhakaran, Venugopal und Ramakrishna 2009). Dabei handelt es sich um eine Poly(α -hydroxysäure). Dieses Material wird in der Medizin häufig in Form von Nahtmaterial verwendet, da es körpereigen abgebaut werden kann.

Die Arbeitsgruppe der Orthopädie im Universitätsklinikum Marburg konnte zeigen, dass auf Kollagenscaffolds die Zellproliferation sowie die Zelldifferenzierung von hMSC größer ist als auf synthetisch gesponnenen Poly(L-lactid)-Scaffolds (Schofer et al. 2009b). Diese Effekte zeigten sich auch in anderen Arbeitsgruppen nicht nur bei hMSC auf Kollagenscaffolds, sondern auch bei Muskelzellen oder Fibroblasten (Venugopal, Zhang and Ramakrishna 2006, Venugopal et al. 2005, Shih et al. 2006). Gleichzeitig bot das Kollagen in Bezug auf seine mechanische Stabilität und Belastung Nachteile. Es ließ sich leicht verspinnen (Matthews et al. 2002) und auch die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur stellte keine Schwierigkeiten dar, jedoch zeigten sich während der Kultivierung der Zellen über 22 Tage große Defekte im Nanofasernetz im Gegensatz zu den Poly(L-lactid)-Fasern (Schofer et al. 2009b). Um diesen nachteiligen Effekt zu überwinden, wurden unterschiedliche Strategien entwickelt. Zum einen wurden die Poly(L-lactid)-Fasern so verändert, dass sie besseres Zellwachstum ermöglichen. Dazu wurde BMP verwendet, welches als Differenzierungsfaktor fungiert. Schofer et al. konnten zeigen, dass BMP-haltige Poly(L-lactid)-Nanofasern die Osteoblastenaktivität erhöhen (Schofer et al. 2008). In mehreren Arbeiten konnte BMP in Poly(L-lactid)-Polymeren verarbeitet werden ohne seine biologische Aktivität zu verlieren.

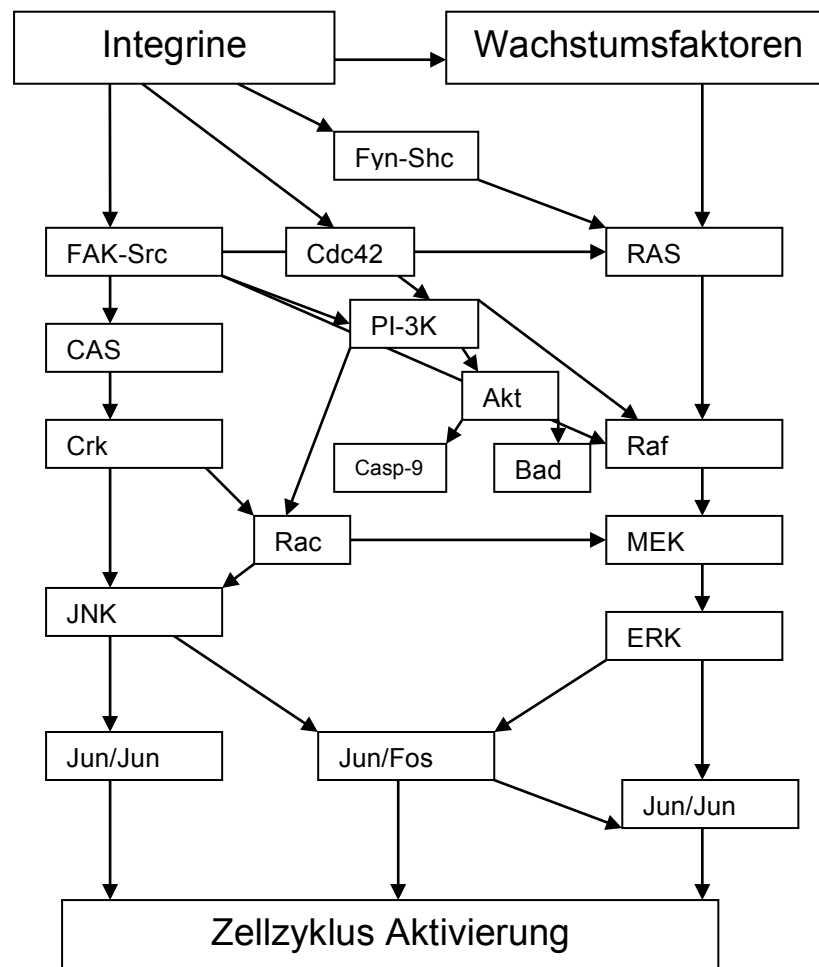
Zum anderen wurden sogenannte Blends hergestellt, welche sich aus Kollagen und Poly(L-lactid) zusammensetzten um die Stabilität der synthetischen Poly(L-lactid)-Nanofasern und die erhöhte Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu vereinen (Schofer et al. 2009a).

Der wachstumsfördernde Effekt sowie der beschleunigte Effekt für die Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten wird durch das Kollagen über eine Interaktion mit dem Integrinrezeptor induziert (Salasnyk et al. 2004, Mizuno and Kuboki 2001). Dieser Effekt ließ sich in Kollagen-Nanofasern (Shih et al. 2006) und auch in Blends, bestehend aus Kollagen oder Gelatine (Hu, Liu und Ma 2008, Kim, Yu and Lee 2008), zeigen.

2.6 Biologische Aktivität von RGD-Sequenzen

Nach derzeitigen Forschungsergebnissen wird davon ausgegangen, dass die Wirkung des Kollagens zum großen Teil auf die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) zurückzuführen ist (Taubenberger et al. 2010). Deshalb wurden in bereits zahlreiche Oberflächen bzw. Materialien RGD funktionalisiert (Hersel, Dahmen und Kessler 2003).

Die RGD-Sequenz interagiert an der Zelle mit den Integrinrezeptorfamilien $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, $\alpha1b\beta3$ und $\alpha1\beta5$ (Hynes 2002). Die Integrinrezeptoren liegen transmembranär und sind für intrazelluläre Signaltransduktionen elementar. Sie triggern mittels Ca^{2+} - Einstrom, Tyrosinkinaseaktivität und verschiedene GTPasen die Zelladhäsion (Giancotti und Ruoslahti 1999). Abb. 2 zeigt den Signaltransduktionsweg der Integrinaktivierung mit beteiligten Proteinen im Zellzyklus, welche schließlich die Zellprogression bedingen.

**Abbildung 2:**

Signaltransduktion über Integrinrezeptoren im humanen Zellzyklus (Giancotti and Ruoslahti 1999)

In der Tumorforschung werden RGD-Sequenzen verwendet um das Zellwachstum der Tumorzellen zu beeinflussen. Liu et al. konnten in einem U87MG Tumormodel zeigen, dass über die Zugabe von RGD-Sequenzen mit deren Wirkung über den Integrinrezeptor $\alpha\beta_3$, erhöhte Akkumulationen der Tumorzellen und eine erhöhte Tumormasse auftraten (Liu et al. 2010).

Neben der Tumorforschung wurden auch im Rahmen des Tissue Engineering bereits RGD-Sequenzen zur Anregung des Zellwachstums verwendet. Mandal et al. versahen Seidenfilmoberflächen mit RGD-Sequenzen und konnten erhöhtes Wachstum und höhere Zelldichten von Rattenzellen auf diesen Filmen nachweisen (Mandal et al. 2010). Ähnliches konnte für Polyelectrolyte-multilayer (PEM) Membranen gezeigt werden, auf denen MG63 osteoblastenähnliche Zellen ausgesiedelt wurden und auf RGD-haltigen Membranen vermehrt adhärten und wuchsen (Tsai et al. 2010). Für eine verbesserte Zelladhäsion auf glatten Oberflächen verfilmten Groll et al. Glas, Silikon und Titanoberflächen mittels einer poly(ethylene glycol)-Schicht und

versahen diese mit linear angeordneten RGD-Sequenzen in unterschiedlichen Konzentrationen. Über 30 Tage kultivierten sie hMSC auf diesen und beobachteten nach 14 Tagen einen Anstieg der osteogenen Marker und eine RGD-konzentrationsabhängige Zelldichte (Groll et al. 2005). Zusammenfassend lässt sich in der Literatur ein wachstumssteigernder Effekt von Zellen auf RGD-haltigen Materialien finden.

2.7 Ziel der Arbeit

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass sich sowohl das Elektrosponnen von Nanofasern als auch Poly(L-lactid) für deren Grundsubstanz für den Einsatz des Tissue Engineering als sinnvoll erweisen. Kollagenhaltige Fasern zeigten sich in Hinblick auf das Zellwachstum und ihre Differenzierung effektiver als das Poly(L-lactid), boten aber nicht die notwendige mechanische Stabilität.

Das Ziel dieser Arbeit ist es die mechanisch stabileren Poly(L-lactid)-Nanofasern mittels der integrinbindenden RGD-Sequenzen zu funktionalisieren, um eine bessere Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung auf den synthetischen Fasern zu ermöglichen und ein stabiles biologisch abbaubares Scaffold für das Tissue Engineering zu entwickeln. Das Scaffold soll die Voraussetzungen für die Replantation in vivo erfüllen, um für den klinischen Alltag eine Verbesserung der Behandlung knöcherner Defekte zu erzielen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Polymer:

Pol(L-lactid) (PLLA), Resomer 210 (BOEHRINGER)

Lösungsmittel:

Dichlormethan, >99,8% (SIGMA-ALDRICH)

Ethanol, ≥99 % (ROTH)

Reagenzien, Medien und Material:

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (Fluka)

Standardmedium (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Low Glucose (GIBCO)):

- 500 ml DMEM low Glucose
- 10% FCS
- 1% Penicillin / Streptomycin

Differenzierungsmedium (Osteogenesis Induction Medium) (OIM)

- 500 ml DMEM low Glucose
- 10 % FCS
- 5 ml Penicillin / Streptomycin
- 10 mM β -Glycerolphosphat (1,08 g pro 500 ml Medium)
- 0,05 mM Ascorbin-Acid-2-Phosphate (0,25 M stock) (10 μ l pro 50 ml Medium)
- 0,1 μ M Dexamethason (1 mM stock in 100% Ethanol)

Für das Differenzierungsmedium wurden sowohl die Ascorbinsäure, wie auch das Dexamethason jeweils frisch zum Medium bei Mediumwechsel dazugegeben und in der 0,05 mM oder 0,1 μ M Lösung bei -20°C gelagert.

PBS-Dulbeco, w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , LE, steril (BIOCHROM)

FCS (Biochrom)

Penicillin/Streptomycin (PAA)

β -Glycerolphosphat (Sigma)

Ascorbin-Acid (Sigma)

Dexamethason (Calbiochem)

β -Mercaptoethanol (Merck)

Trypsin (Gibco)

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) (Fluka)

N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) (Fluka)

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Monohydrat (Fluka)

DMSO (Serva)

Fluoromount G (Biozol)

Fluoresceinisothiocyanat-konjugiertes RGD (AnaSpec)

Lineares RGD (AnaSpec), GRGDSPK

Cyclisches RGD (AnaSpec), cyclo(-RGDfK)

Parafilm® M (ROTH)

Falcon-Röhrchen (Greiner-Bio-One)

Kulturflaschen (Greiner-Bio-One)

Pipetten (Greiner-Bio-One)

Perfusorspritzen (Braun)

Einweg- Sterilfilter (0,45 μ m) (Schleicher & Schuell)

Immunfluoreszenzfarbstoffe und Antikörper:

COL1 (Abcam, Ab6308, Cambridge, United Kingdom)

OC (Acris, BP710, Hiddenhausen, Germany)

Ki-67 (Darko, Hamburg, Germany)

Cy-2- und Cy-3-Antikörper (Dianova, Hamburg, Germany)

Kits und Material für rt-PCR:

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

Eppendorf Perfect RNA (Eppendorf)

cMasterRT Kit (Eppendorf)

oligo dT (Qiagen)

RealMasterMix Sybg (Eppendorf)

Primer: (Tip Molbiol, Berlin)

Zielgen 18SrRNA

Forward: CggCTACCACATCCAaggAA

Reverse: gCTggAATTACCGCggCT

Zielgen Kollagen Typ I

Forward: CAgCCgCTTCACCTACAgC

Reverse: TTTTgTATTCAATCACTgTCTTgCC

Zielgen Alkalische Phosphatase

Forward: gACCCTTgACCCCCACAAT

Reverse: gCTCgTACTgCATgTCCCCT

Zielgen Osteocalcin:

Forward: gAAgCCCAgCggTgCA

Reverse: CACTACCTCgCTgCCCTCC

PCR 100-well plates (Eppendorf)

3.1.2 Geräte

Zentrifuge (Beckmann) CL-GPKZ/GH 3,7rotor

Zentrifuge Biofuge fresco (Heraeus)

Mastercycler-ep-realplex² (Eppendorf) mit Realplex Software (Eppendorf)

PCR Heizblock (Hybaid Omnigene thermocycler) (Thermo Life Sciences)

Inkubatoren (Heraeus)

Die folgenden Geräte wurden durch den Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg verwandt und beschrieben:

Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop JSM-7500F der Firma JEOL mit Kryotransfersystem der Firma GATAN wurde hier verwendet und vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg durchgeführt. Die Proben wurden auf Siliziumträgern präpariert. Für die Untersuchungen wurde eine Platin-Bedampfung in der Einschleusekammer im Gerät selbst durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung wurde probenabhängig zwischen

2 und 5 kV im LEI- oder SEIMode gewählt. Die Auswertung der Faserdurchmesser erfolgte mit der Software „ImageJ“ und „Origin“.

Fluoreszenzmikroskop

Für die Arbeiten mit hMSC wurden die Fluoreszenzmikroskope des Typs DMR-X und für die Auswertungen der Immunfluoreszenz ein DM5000 der Firma LEICA, Wetzlar genutzt. Dazu wurden Mikrofotogramme von drei verschiedenen Gesichtsfeldern aufgenommen. Zur Intensitätsanalyse diente die *Quips Analyse Software*.

Konfokales Fluoreszenzmikroskop

Zur Untersuchung der mit FITC-RGD immobilisierten Fasern wurde das Konfokalmikroskop TCS SP2 der Firma LEICA verwendet. Die Aufnahmen wurden im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg von Dr. Franz Grolig durchgeführt.

Rasterkraftmikroskop

Für Untersuchungen der Oberflächenrauheit der PLLA-Filmen wurde das Rasterkraftmikroskop Nanosurf® easyScan 2 eingesetzt. Die Blattfeder (Cantilever) blieb dabei im Kontakt mit der Oberfläche. Die Kraft zwischen der Spitze und der Probe blieb gleich (*contact force mode*). Die Auswertung erfolgte mit der Software *Nanosurf Report 4.1* durch den Fachbereich Chemie.

Zug-Dehnungs-Messungen

Es wurde das Zug-Dehnungs-Messgerät *zwicki-Line* von Zwick GmbH & Co. KG, Ulm verwendet. Es wurden die Zuglast in Newton und die Dehnung in Millimeter ermittelt. Die Zugfestigkeit, die Dehnung und das Elastizitätsmodul wurden mit der Software von Zwick GmbH & Co. KG, Ulm durch den Fachbereich Chemie ausgewertet.

Kontaktwinkelmessungen

Die statistischen Kontaktwinkel von Wasser wurden mit dem manuellen

Kontaktwinkelmessgerät G 10 von der Firma Krüss (Hamburg) bestimmt und mit dem Programm SCA20 der Firma Data Physics durch den Fachbereich Chemie ausgewertet.

Plasmagenerator

Die Faserproben wurden in den Plasmagenerator *Edwards MPG 137 RF power generator* gestellt und bis zu einem Niederdruck von 0,0133 mbar evakuiert. Anschließend wurde die Kammer mit Sauerstoff bis zu einem Innendruck von 0,133 mbar gefüllt. Zur Erzeugung des Sauerstoffplasmas wurden 30 Watt (reflected power) und 100 Watt (forward power) für eine Zeitdauer von 1 bis 10 Minuten eingestellt. Es wurde ein Gitterstrom von 6 mA erreicht. Der Anodenstrom zeigte 2 Ampere an. Zur Entnahme der Faserproben wurde die Kammer mit Außenluft gefüllt und Proben vorsichtig entnommen.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung von hMSC

Zur Gewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) wurde nach bestehendem Ethikvotum vom 26.03.2008 (Az:30/06) durch die Ethikkommission der Philippsuniversität Marburg beim Einbau von Hüfttotalendoprothesen bei Arthrose im Fachbereich Orthopädie der Universitätsklinik Marburg Spongiosa aus dem Knochenschaft gewonnen. Die Patienten wurden in Rahmen der präoperativen Vorbereitung über den Vorgang aufgeklärt und gaben ihre Einwilligung. Die Patienten zeigten keine Hinweise auf andere Knochen- oder Autoimmunerkrankungen.

Unter sterilen Bedingungen wurde die Spongiosa mit Hilfe eines Luer in einige Millimeter kleine Stücke geschnitten, mit PBS verdünnt und auf Ficoll-Paque geschichtet. Nach anschließender Zentrifugation für 20 min bei 1.680 g kam es zur Phasentrennung, so dass die mononuklearen Zellen über der Ficollschicht mit einer Glaspipette abgenommen werden konnten. Nach erneuter Verdünnung auf 50 ml mit PBS, Zentrifugation (1.280 g für 5 min) und dem

Abkippen des Überstandes, konnten die gewonnen Zellen in 12 ml Vollmedium (DMEM + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) in eine 75 cm² Kulturflasche gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gebracht werden.

3.2.2 Kultivierung der hMSC

Die 12 ml Vollmedium wurden alle 3 bis 4 Tage gewechselt und die hMSC mit 12 ml frischem Medium versehen. Waren die Zellen zu ca. 70% konfluent wurden sie im Verhältnis 1:4 geteilt. Dafür wurde das Medium aus der Kulturflasche verworfen. Die hMSC wurden zusätzlich mit 10 ml PBS gespült welches ebenfalls anschließend verworfen wurde. Mit 2 ml Trypsin versehen wurden die Zellen für 5 min in den Inkubator gestellt. Nach dem Ablösen der Zellen wurde das Trypsin mit frischen 10 ml Medium abgestoppt. Die lysierten Zellen wurden im 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1.280 g für 5 min hinunter zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit 5 ml PBS resuspendiert. Nach Auffüllen auf 50 ml PBS ein weiteres Mal bei 1.280 g für 5 min zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes erfolgte die erneute Resuspension des Zellpallets mit 12 ml Medium. Es wurden jeweils 4 Gewebekulturflaschen mit je 9 ml frischem Medium und mit 3 ml aus dem Zellgemisch befüllt. Die MSC wurden bis zur Passage 3 kultiviert. Die Kultivierung erfolgte beständig bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

3.2.3 Kryokonservierung der hMSC

Einfrieren

Die hMSC wurden wie oben beschrieben zum Passagieren vorbereitet. Jedoch erfolgte die letzte Resuspension nicht in reines Vollmedium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, sondern in Einfriermedium welches aus 50% FCS, 40% Vollmedium und 10% steril filtriertem DMSO bestand. Die Zellen wurden im Splittungsverhältnis 1:4 auf die Kryoröhrchen aufgeteilt. Das Einfrieren erfolgte langsam entweder über Nacht bei -20°C und am Folgetag die Überführung in -80°C oder im Isopropanol-Ständer direkt in den Gefrierschrank von -80°C.

Auftauen

Die Kryoröhrchen mit dem Zellmediumgemisch wurden schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Sofort wurde die Zellsuspension in 30 ml vorgewärmtes Vollmedium gegeben und bei 4°C und 1.280 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert um das verbliebene DMSO herauszuwaschen. Schließlich wurde das Pellet mit 12 ml Vollmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt, um bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert zu werden.

3.2.4 Durchführung der Zellversuche

Für die vorliegenden Versuche wurden die eigens gewonnenen hMSC, wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben, bei 37°C und 5% CO₂ in Vollmedium kultiviert. Zur Besiedelung der Scaffolds wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin gelöst und nach zweimaligem Zentrifugieren in Vollmedium aufgenommen. Es erfolgte die Auszählung der Zellen mit der Neubauer Zählkammer. 12.500 hMSC wurden gelöst in frischem Medium auf das jeweilige Scaffold gegeben und über 22 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Jeden zweiten Tag erfolgte der Mediumwechsel. Probenentnahmen fanden an Tag 4, Tag 10 und Tag 22 statt. Die hMSC stammten von drei verschiedenen Patienten für jede Scaffoldgruppe.

3.2.5 FACSanalyse der hMSC

Um das Vorliegen von Stammzellen sicherzustellen wurden die hMSC's mittels flow cytometric antigen expression zusammen mit den Mitarbeitern des Forschungsbereichs Hämatonkologie des Universitätsklinikums Marburg analysiert. Zur Beschreibung der Oberflächenmoleküle wurden 105 Zellen in 100 ml PBS inkubiert und erhielten für 20 min bei 4°C Flurochrom gebundene monoklonale Antikörper. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 300 ml PBS aufgenommen und in der Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis ausgewertet (FACScan, Becton Dickinson, SanJose, CA, USA). Folgende Antikörper wurden dabei eingesetzt: CD45-FITC (PharMingen, San Jose, CA,

USA), CD90-FITC (PharMingen), CD34-PE (PharMingen), CD14-PE (Becton Dickinson), CD31-PE (Beckman Coulter, Krefeld, Germany), IgG-FITC und IgG-PE (Becton Dickinson). Der CD105 Antikörper (PharMingen, San Jose, CA, USA) wurde indirekt angefärbt mittels goat anti-mouse PE secondary antibody (PharMingen, San Jose, CA, USA).

Innerhalb dieser Versuche wurden hMSC's kultiviert, welche negativ für hämatopoetische Stammzellmarker, für Makrophagen (CD14, CD45), Blutvorläuferzellen (CD34, CD45) und Endothelvorläuferzellen (CD34, CD31) waren. Positiv zeigten sie sich für die Stammzellmarker (CD90, CD105).

3.2.6 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ist ein geeignetes Verfahren um durch Fluoreszenzfärbungen einzelner Zellbestandteile, die Zellzahl (mittels Zellkern-Dapi-Färbung), die Proliferationsrate (mittels des Proliferationsmarkers Ki67) oder die Differenzierung (Nachweis von Osteocalcin durch entsprechenden Antikörper) zu bestimmen.

Bevor die Nanofaser-Objektträger gefärbt werden konnten, wurden sie mit 1 ml Methanol für 5 min bei -20°C im Gefrierschrank fixiert. Anschließend wurde 1ml Aceton für 1 min bei -20°C auf die Fasern gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurde das Aceton abpipettiert. Sobald die Objektträger getrocknet waren, wurde die Immunfluoreszenzfärbung begonnen.

Um unspezifische Bindungen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern wurde zunächst für 30 min mit 1:20 verdünntem Eselserum bei Raumtemperatur geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 10 min erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers (Kollagen I oder Ki67) für 1 h bei Raumtemperatur. Der Kollagen I-AK bindet an synthetisiertes Kollagen und wurde in einer Verdünnung von 1:500 in PBS verwandt. Ki67 ist ein Marker der Proliferation und wurde in einem Verhältnis von 1:75 mit PBS vermischt. Nach Ablauf der Inkubation wurde nach wiederholten Waschvorgängen mit PBS der sekundär Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur hinzupipettiert. Dabei handelt es sich um Cy3-Anti-Kaninchen-IgG (Verdünnung von 1:100 in PBS). Ab hier erfolgten die Arbeitsschritte im abgedunkelten Raum um den Zerfall der Farbstoffe unter Licht zu verhindern. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut

gewaschen und an Tag 22 des Versuchsdurchlaufs erfolgte die Färbung mit dem zweiten Primärantikörper Osteocalcin (Verdünnung von 1:30 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde auch hier der Sekundärantikörper Cy2-Anti-Maus-IgG (Verdünnung 1:100 in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur zur Fluoreszenzfärbung dazugegeben. 50 µl des Dapi-Kernfarbstoffs (Verdünnung 1:20.000 in PBS) für 30 sec. auf jeder Probe färbten die Zellkerne, bevor ein erneuter Waschvorgang erfolgte. Die Proben wurden getrocknet, darauf folgend mit Fluoromount G eingedeckelt und die Aufnahme unter dem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

3.2.7 Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR dient der Quantifizierung von Transkriptionsprodukten mittels Polymerasekettenreaktion.

Isolierung der RNA

Die RNA wurde mittels RNeasy Mini-Kit (Qiagen) isoliert. Zur Vorbereitung wurden 10 µl β-Mercaptoethanol/ml RLT-Puffer hinzugegeben. Der RPE-Puffer wurde mit 4 vol. Ethanol versetzt. Die Lysierung der Zellen erfolgte mittels 350 µl RLT-Puffer und dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol. Die 700 µl Zelllysate wurden auf die Qiagen Säulchen pipettiert und bei 10.000 UpM für 15sec. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurden 700 µl RW1 Puffer hinzugegeben und es erfolgte wiederholt die Zentrifugation bei 10.000 UpM für 15 sec.. Nach Verwerfen des Eluats wurde unter 500µl hinzugegebenem RPE Puffer erneut bei 10.000 UpM für 15 sec. zentrifugiert. Auch dieses Eluat wurde noch verworfen, bevor erneut 500 µl RPE Puffer auf die Säulchen gegeben wurden. Zentrifugiert wurde nun für 2 min bei 10.000 UpM. Nach dem Überführen der Säulchen auf ein neues E-cup wurden 25 µl RNase freies Wasser hinzupipettiert und es folgte die Zentrifugation für 2 min bei 10.000 UpM. Das Eluat wurde nicht verworfen und der gleiche Vorgang mit neuen 25 µl RNase freiem Wasser wiederholt. Die gewonnene RNA ging nun in die cDNA-Synthese ein.

cDNA-Synthese

Anzusetzen war nun zunächst für jede Probe in ein 0,5 ml Eppi der Mastermix 1, bestehend aus dNTP-Mix [10 mM each] mit einem Volumen von 2 µl, oligo dT [0,5 µg/µl] von 1 µl und der template RNA von 7 µl. Der Mastermix 1 wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

In der Zwischenzeit konnte der Mastermix 2 hergestellt werden, bestehend aus 5 µl PCR Puffer mit Mg^{2+} und 0,4 µl cMaster Enzymmix pro Probe. Dieser wurde zum Mastermix 1 hinzupipettiert und gut durchmischt. Bei 42°C wurde dieses Gemisch über 90 min inkubiert. Danach folgten 5 min bei 85°C im Heizblock. Die fertige cDNA konnte entweder bei -80°C zur späteren Probenverarbeitung tiefgefroren werden oder direkt für die rt-PCR verwendet werden.

rt-PCR

Die rt-PCR wurde nach dem Protokoll des RealMasterMix Sybg (Eppendorf) durchgeführt.

Die entsprechenden PCR-Primer (siehe Punkt 2.1.1) wurden laut Herstellerangaben (50 pMol/µl) mit RNase freiem Wasser verdünnt. Zum RealMasterMix (Eppendorf RealMasterMix Sybg) wurden 125 µl SYBG pipettiert.

Pipettiert wurde nach dem 50 µl-Ansatz in eine 96-Well-PCR-Platte (Eppendorf, PCR-Plate). Pro Well galt hier wie folgt: 0,1 µl PCR-Primer forward und 0,1 µl PCR-Primer reverse, 22,5 µl RealSYBER-Mix mit SYBG, entsprechend gewonnene cDNA-Menge auf 10 µl mit RNase freiem Wasser verdünnt und schlussendlich Auffüllung des Wells auf 50 µl mit RNase freiem Wasser.

Die Durchführung der PCR erfolgte durch die mastercycler Software (Eppendorf). Das Programm führte zunächst über 15 min eine Enzymaktivierung bei 95°C durch. Darauffolgend wurde die Denaturierung bei 95°C für 15 sec. mit anschließendem Annealing für 30 sec. bei 54°C und die Extension bei 72°C für 30sec. in 40fachem Zyklus durchgeführt. Die Melting curve schloss sich mit 95°C und 60°C an. Die anschließende Auswertung erfolgte mittels der $\Delta\Delta Ct$ Methode.

3.2.8 Elektrosponnen und Fasercharakterisierung

Für die Zellversuche mit mesenchymalen Stammzellen wurden die Fasern auf sterile runde Glasplättchen (Durchmesser = 16 mm) gesponnen. Damit die Nanofasern auf der Glasoberfläche hafteten, wurden diese lipid- und staubfrei gereinigt. Hierfür wurden die Objektträger über 12 Stunden in einem Gemisch aus 78% Aqua dest., 20% 99%tigem Ethanol und 2% Eisessig auf einem Schüttler belassen. Am Folgetag wurde die Lösung aufgeköcht. Die Objektträger konnten schließlich mit Staubfreitüchern gereinigt und anschließend autoklaviert werden, bevor sie in den Spinnvorgang eingingen. Das Elektrosponnen der PLLA-Nanofasern erfolgte mit Unterstützung des Fachbereichs Chemie AG Wendorf.

Dazu wurden sie in die zuvor desinfizierte Elektrosponnanlage eingeschleust und auf eine desinfizierte Glasplatte (12 × 12 × 0,5 cm) ausgelegt. Die Polymerlösung wurde in die mit der Elektrode verbundene Spritze eingefüllt. Bei dem hier verwendeten Nanofaser-Polymer handelt es sich um Poly(L-lactid) Resomer L 210 von Boehringer. Die PLLA-Lösung lag in 4 wt% vor und wurde mit Dichlormethan gelöst.

Der Elektrodenabstand wurde in den Versuchen auf 15 cm eingestellt. In modifizierten Versuchen wurde ein sich drehender Untergrund verwendet. So konnten gleichzeitig bis zu 20 Glasplättchen gleichmäßig besponnen werden. Für die vorliegenden Experimente wurde die relative Luftfeuchtigkeit je nach Bedarf bei 50% oder auch zur Herstellung glatter PLLA-Fasern unter 15% gehalten. Die Umgebungstemperatur lag möglichst konstant bei 22°C. Die Flussrate betrug 0,3 ml/h bei 25 Kilovolt Hochspannung.

Nach dem Spinnen wurden die Scaffolds verpackt und unter der sterilen Werkbank wurde das Nanofasernetz mit Hilfe der Polymerlösung mit dem Glasplättchenrand verklebt.

3.2.9 Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-linRGD (s)

Die verwendeten RGD-Sequenzen liegen in unterschiedlicher Konformation vor. Zum einen findet sich eine lineare Folge von Arginin, Glycin und Aspartat,

pulverform vorliegenden RGD-Sequenzen jeweils einmal in zyklischer und einmal in linearer Form vorliegend in jeweils 1 ml PLLA-Lösung für 30 min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurde die Suspension wie bei oben angegebenen Parametern versponnen.

Für die Verteilungsuntersuchungen wurde eine FITC-RGD/PLLA-Suspension mit 1 mg FITC-RGD in 1 ml PLLA-Lösung hergestellt und anschließend zu Fasern versponnen. Die oben genannten Parameter blieben während des Spinnprozesses gleich.

3.2.10 Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Emulsion – PLLA-cRGD (d)

Für die RGD-haltigen Fasern wurde 4,44 wt.% PLLA-Lösung verwendet, in der 1,11 g PLLA-Granulat und 23,95 g Dichlormethan bei Raumtemperatur gelöst enthalten waren. Das 1 mg in Pulverform vorliegende cyclische RGD wurde in einem Milliliter doppelt destilliertem Wasser gelöst. 0,9 ml der 4,44wt.%igen PLLA Lösung wurde mit 100 µl der 0,1 mg/ml cRGD-Lösung versetzt und im Vortex Mixer für einen Zeitraum von 5 min verrührt bis eine PLLA-cRGD-Emulsion hergestellt war.

Diese Emulsion wurde für das Faserspinnen über eine 1 ml Spritze aufgenommen und durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,45 mm gedrückt. Diese war einem elektrischen Feld von 20 kV ausgesetzt. Der Abstand zur Gegenelektrode auf der sich die Glasplättchen befanden betrug ca. 15 cm. Die Flussrate wurde bei 0,12 ml pro Stunde gehalten.

Zur Herstellung der FITC-RGD/PLLA-Emulsion wurden 100 µl einer 0,1 mg/ml FITC-Lösung (PBS-Puffer) und 0,9 ml einer 4 wt.% PLLA-Lösung miteinander verrührt und anschließend zu Fasern versponnen. Die Spinnparameter wurden hier wie oben genannt beibehalten.

3.2.11 RGD-Kopplung mittels EDC und NHS

Die folgenden Arbeitsschritte wurden mit freundlicher Unterstützung des Fachbereichs Chemie AG Wendorf durchgeführt.

Für die Funktionalisierung der Fasern wurden zunächst glatte PLLA-Fasern unter Verminderung der Luftfeuchtigkeit auf runde sterile Glasplättchen gesponnen wie bereits unter Punkt 2.2.6.1 beschrieben.

Die Fasern wurden anschließend für 2 min oxygen-plasma behandelt. Dies diente zur Generierung der Carboxylgruppen auf der Oberfläche. Diese stellen den Anker für die nachfolgenden Kopplungsreaktionen dar. Die plasmaaktivierten Fasern wurden mit 1-Ethyl-3-(3-demethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydrobysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) behandelt um die Voraussetzungen für eine kovalente Bindungen zwischen der Faseroberfläche und den RGD-Sequenzen zu schaffen. Das Sulfo-NHS ermöglicht über die Aminogruppe des Lysins der RGD-Sequenz die Bildung einer stabilen Amidbindung (Abb. 5).

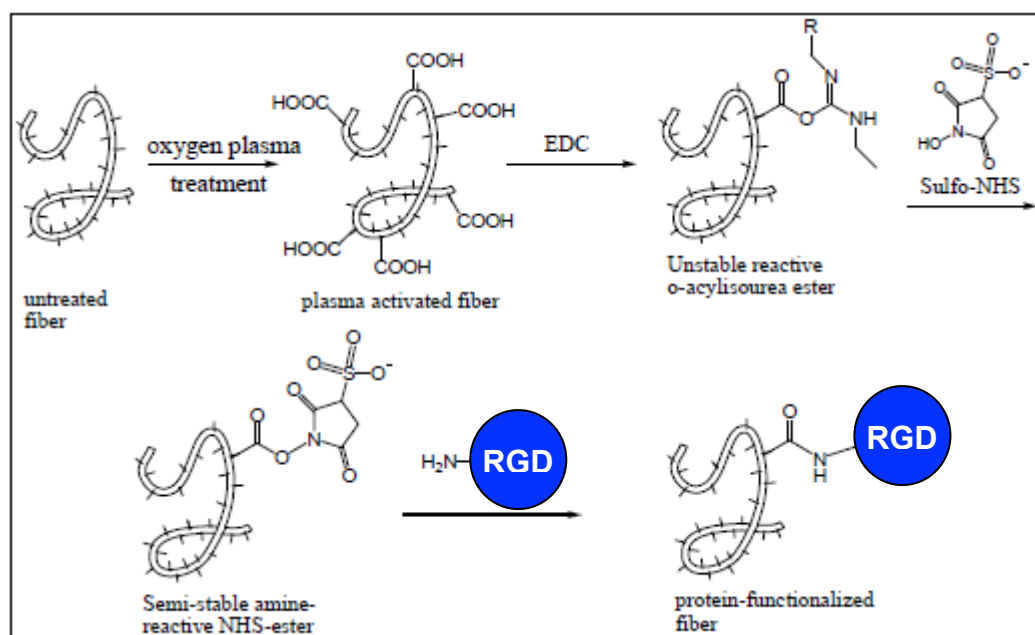


Abbildung 5: Kopplungsschritte der aktivierten PLLA-Nanofaser für die RGD-Sequenz

4 Ergebnisse

4.1 Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-linRGD (s)

Die RGD-Sequenzen stehen in unterschiedlicher Konformation zur Verfügung (siehe Abschnitt 3.2.9). Ziel sollte es sein herauszufinden, welche Struktur bessere Effekte der Zelladhäsion oder des Wachstums der hMSC zu erzielen vermag. Verglichen wurden die oben angeführten linearen RGD-Sequenzen mit der zyklischen Formation der Aminosäuren. Die RGD-Sequenzen wurden jeweils mittels Suspension wie unter Punkt 3.2.9 erläutert in die PLLA-Fasern eingebracht.

4.1.1 Adhäsion der hMSC auf linRGD-haltigen und cRGD-haltigen Nanofasern

Um die Adhäsion der hMSC auf den RGD-haltigen Scaffolds zu quantifizieren wurden 12.500 Zellen/Deckglas in Vollmedium ausgesäht und über 4 h bei 37°C und 5% CO₂ auf reinen Poly(L-lactid)-Fasern, auf linRGD-haltigen Fasern, auf cRGD-haltigen Fasern und auf reinen Glasdeckgläschen inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgenommen und die Scaffolds mit 2 ml PBS gespült. Nach der Fixation mit Methanol und Aceton wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben erfolgten eine Dapi-Kernfärbung und die Auszählung der Zellen pro Deckglas innerhalb von drei Gesichtsfeldern unter dem Fluoreszenzmikroskop.

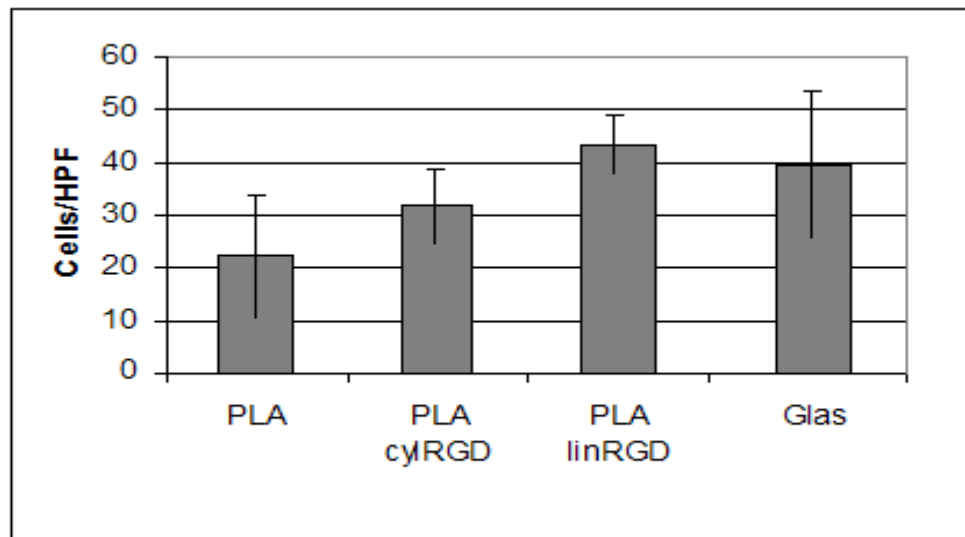


Abbildung 6: Zellzahl nach 4h Adhäsion auf PLLA, PLLA mit cRGD, PLLA mit linRGD und Glas

Nach 4 stündiger Inkubation zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Zellzahl auf den unterschiedlichen Scaffolds. Die cRGD-haltigen und linRGD-haltigen Fasern wiesen nur die Tendenz zur erhöhten Zelladhäsion auf (Abb. 6). Abb. 7 zeigt die Zellen nach Dapi-Kernfärbung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop.

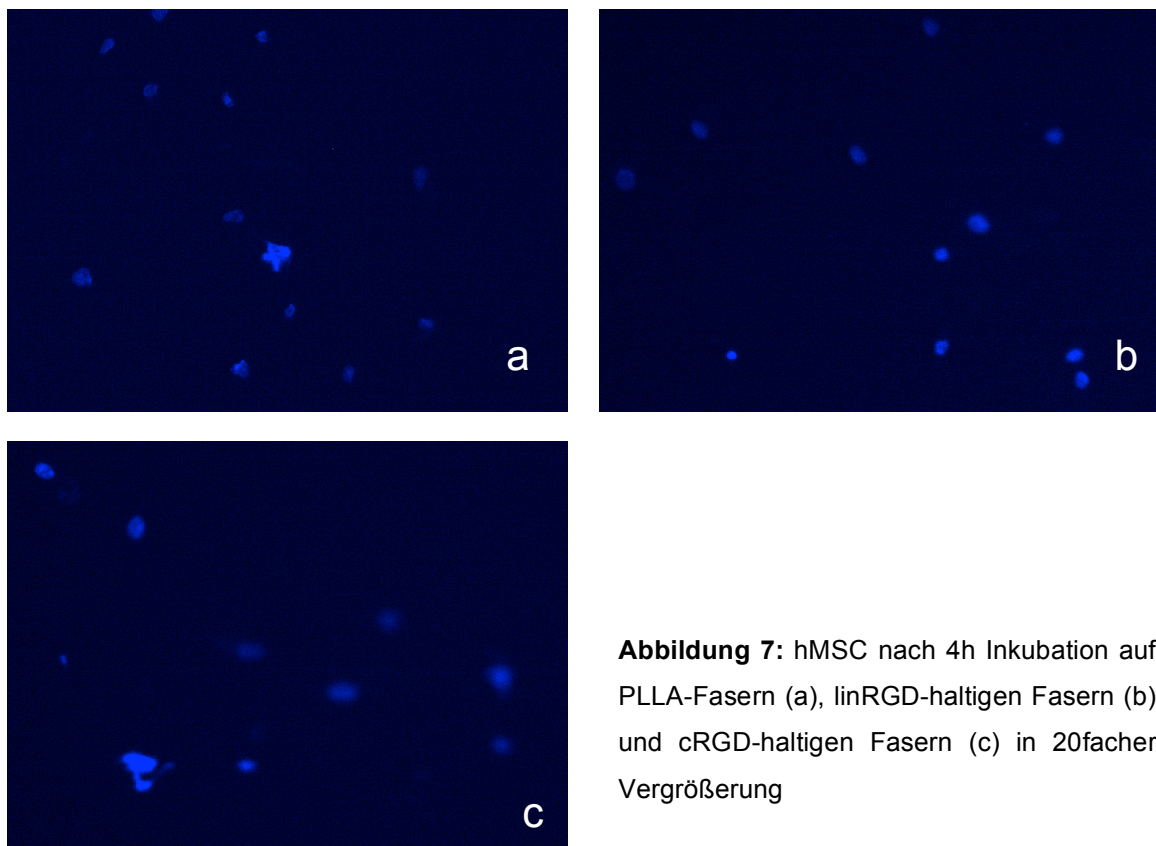


Abbildung 7: hMSC nach 4h Inkubation auf PLLA-Fasern (a), linRGD-haltigen Fasern (b) und cRGD-haltigen Fasern (c) in 20facher Vergrößerung

4.1.2 Matrixformation

Für die Beobachtung des Wachstums, der Proliferation und der Matrixformation wurde ein Versuch von insgesamt 22 Tagen Dauer angesetzt. Die Probenentnahmen fanden an Tag 4, 10 und 22 statt. An Tag 4 wurde eine rt-PCR zum Nachweis der Transkriptionsprodukte sowie eine Immunfluoreszenz mit der Färbung von Ki67 und Dapi durchgeführt, an Tag 10 erneut eine rt-PCR und an Tag 22 wiederholt eine rt-PCR und eine Immunfluoreszenzfärbungen mit Kollagen I und Osteocalcin. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 4 Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Kollagen I-Expression als Differenzierungsmarker auf den unterschiedlichen Fasertypen. An Tag 10 des Versuches zeigte sich zwar ein leichter Anstieg des COLI-Produktes, der aber nicht als signifikant zu werten war. An Tag 22 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Kollagen-Expression für die cRGD-haltigen PLLA-Nanofasern. Bei der Kontrollgruppe der PLLA-Fasern und der linearRGD-haltigen Fasern fand sich dagegen keine vermehrte Expression von Kollagen I (Abb. 8). Für die anderen Transkriptionsprodukte, die eine Aussage über die Differenzierung der Osteoblastenaktivität zulassen, ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Fasertypen feststellen.

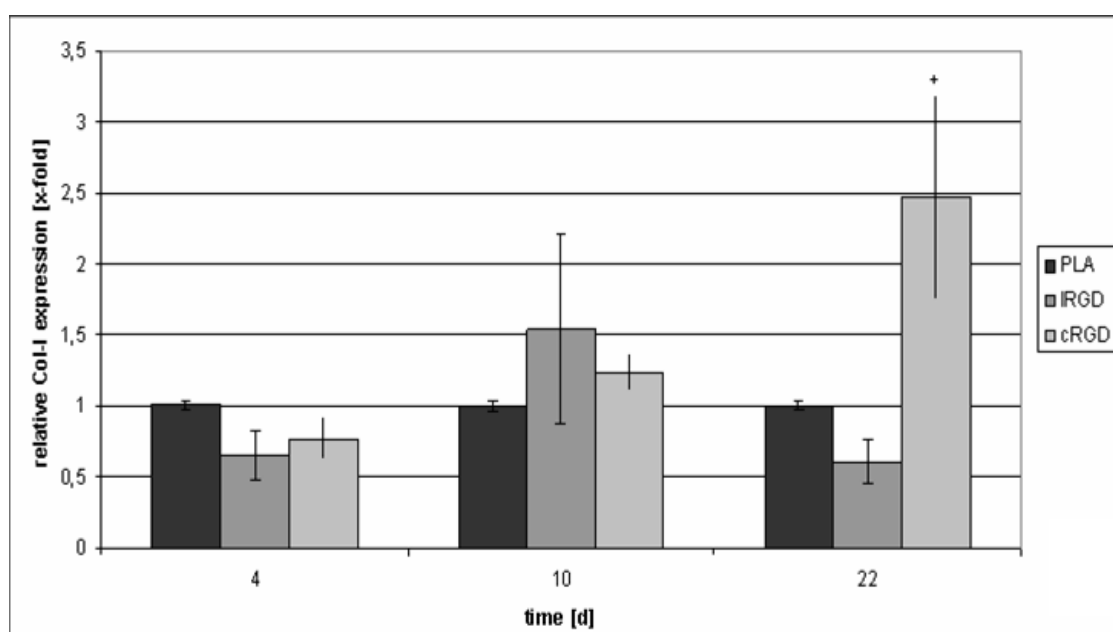


Abbildung 8: Kollagen I-Expression auf unterschiedlichen Fasertypen nach 4, 10 und 22 Tagen

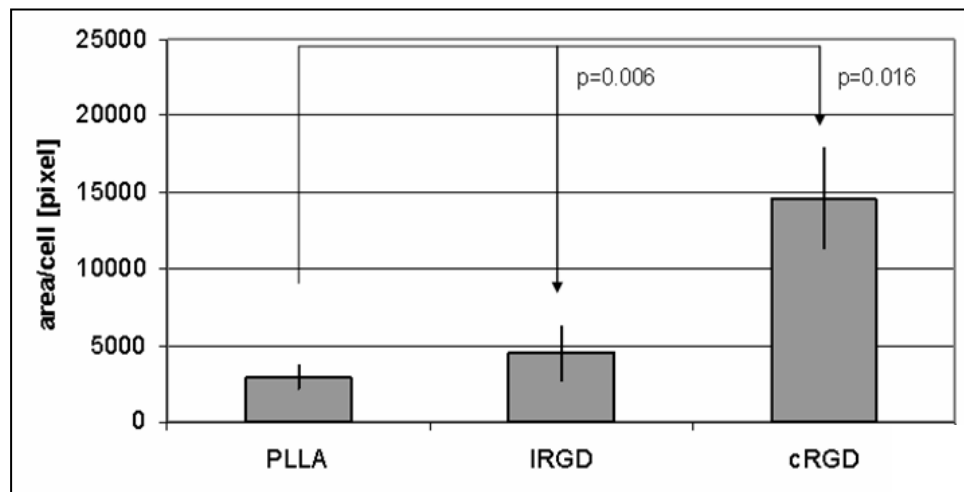


Abbildung 9: Signifikant höhere COLI-Immunfluoreszenz pro Pixel bei linRGD-haltigen und cRGD-haltigen Scaffolds an Tag 22

Die Fluoreszenzmessung der Kollagen I gefärbten Scaffolds an Tag 22 zeigte eine deutlich höhere Fluoreszenz der cRGD-haltigen Fasern mit einem p-Wert von 0.016 im Vergleich zu den PLLA-Scaffolds und der linRGD-haltigen Scaffolds und bestätigte somit die Ergebnisse der rt-PCR (Abb. 10, 11 und 12).

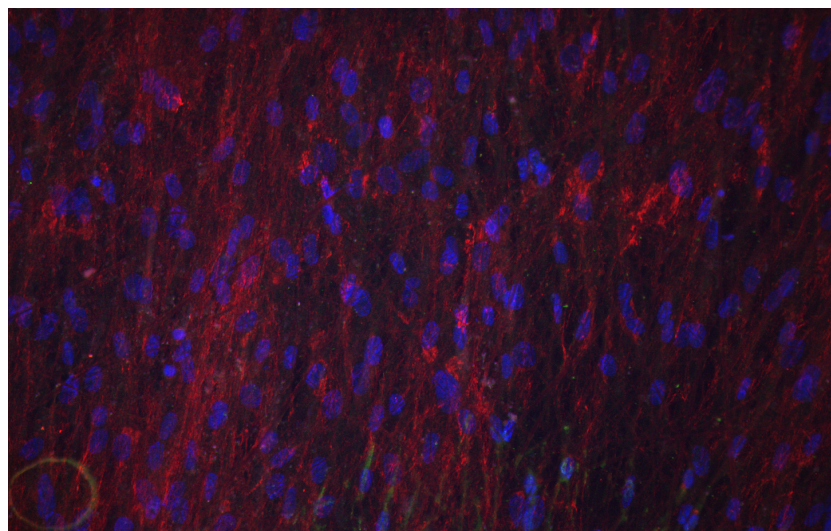


Abbildung 10: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern ohne RGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergrößerung

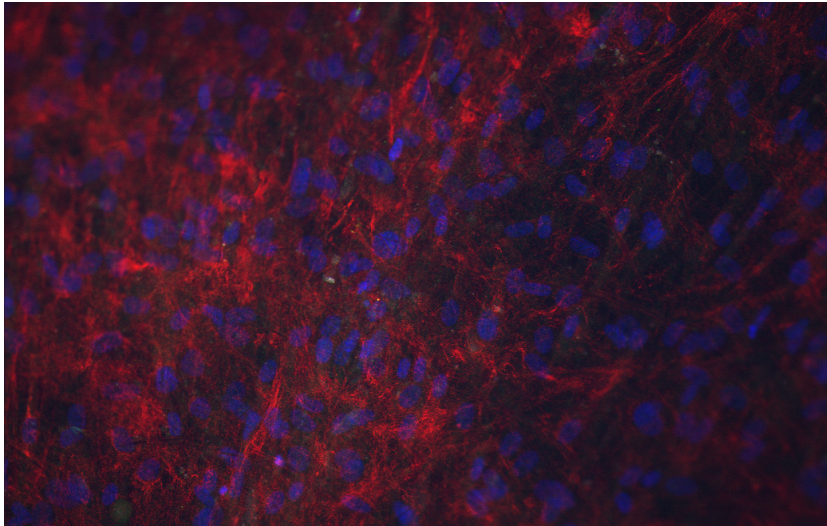


Abbildung 11: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern mit linRGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergrößerung

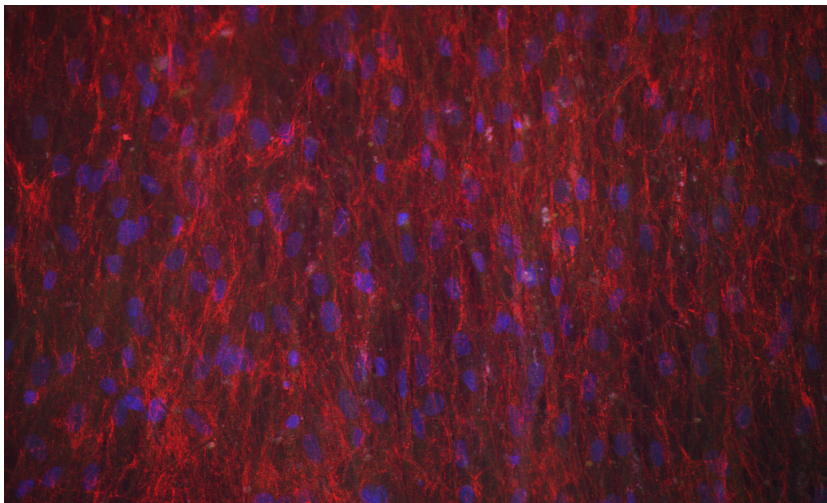


Abbildung 12: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern mit cRGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergrößerung

4.2 cRGD-Inkorporation in PLLA-Nanofasern mittels Emulsion und Suspension – PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s)

Da die zyklischen RGD-Sequenzen im Vergleich zu den linearen Sequenzen die Osteoinduktion der Zellen signifikant erhöhten, wurde in den weiteren Versuchen nur noch mit der zyklisch angeordneten Aminosäureform gearbeitet. Die cRGD-Inkorporation wurde wie in 3.2.9 und 3.2.10 besprochen durchgeführt. Die Immunfluoreszenzmarkierung zum Nachweis der RGD-Sequenzen erfolgte mittels FITC markiertem RGD (FITC-RGD) nach dem beschriebenen Protokoll.

4.2.1 Fasercharakterisierung

Die PLLA-Fasern zeigten ohne cRGD-Zusatz eine glatte Oberfläche mit einem Faserdurchmesser von 1024 ± 693 nm bei einem Kontaktwinkel von $124,3^\circ \pm 17,6^\circ$ (Abb. 13a). Die Einführung der cRGD-Sequenzen mittels Suspension (PLLA-cRGD(s)) führte zur Verminderung des Faserdurchmessers auf 883 ± 450 nm. Der Kontaktwinkel lag hier bei $126,7^\circ \pm 15,2^\circ$ (Abb. 10b). Zum Nachweis des vorhandenen cRGD in den PLLA-Fasern wurde FITC-gebundenes cRGD verwendet, welches sich in der Fluoreszenzmikroskopie in Form von lokalen Spots in den Fasern nachweisen ließ (Abb. 14a).

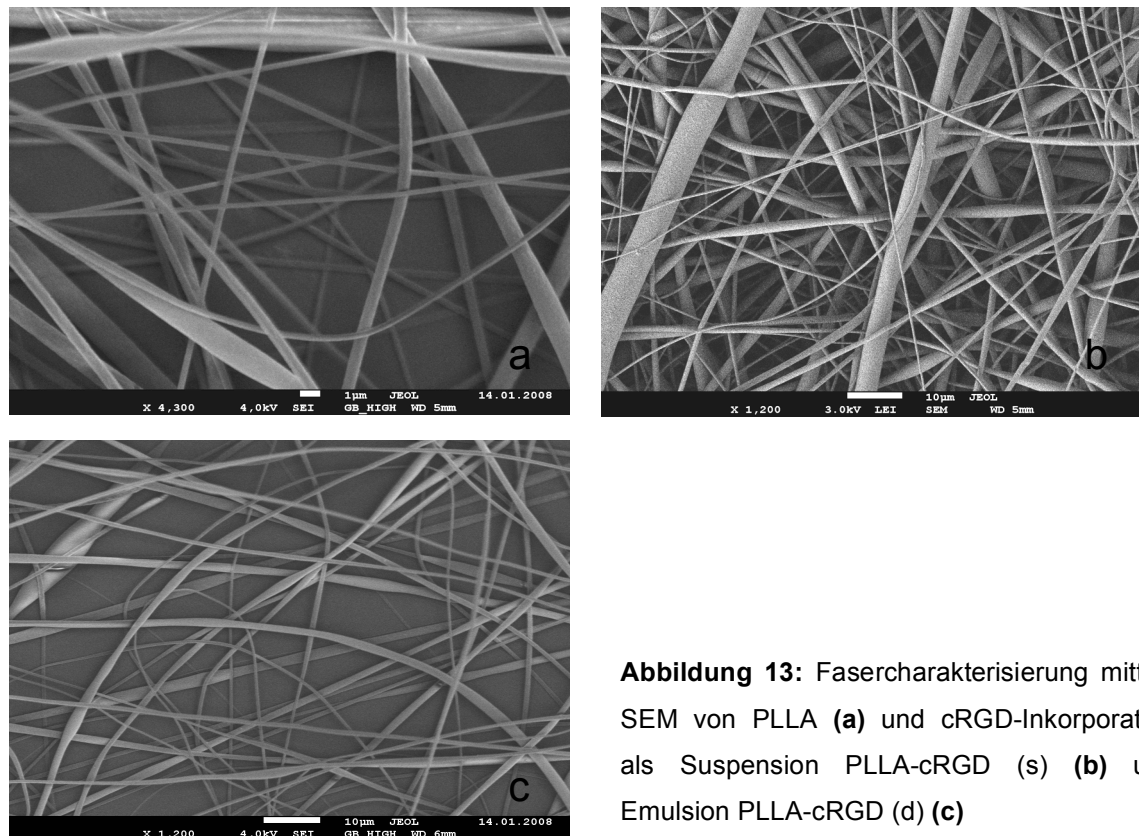


Abbildung 13: Fasercharakterisierung mittels SEM von PLLA (a) und cRGD-Inkorporation als Suspension PLLA-cRGD (s) (b) und Emulsion PLLA-cRGD (d) (c)

Das mittels Emulsion eingebrachte cRGD (PLLA-cRGD (d)) bedingte einen Faserdurchmesser von $792 \pm 735\text{nm}$ und einen Kontaktwinkel von $133,5^\circ \pm 9,8^\circ$ (Abb. 13c).

Auch hier konnte mittels FITC-Markierung das cRGD in der Faser unter Fluoreszenzlicht nachgewiesen werden (Abb. 14b). In Abbildung 14a lassen sich die Spots der cRGD-Sequenzen deutlich erkennen, jedoch erfolgt die Verteilung inhomogen und lässt sich nur an wenigen Abschnitten darstellen. In Abbildung 14b dagegen zeigt sich ein gleichmäßigeres Verteilungsmuster in allen Faserbereichen mit hoher Fluoreszenz.

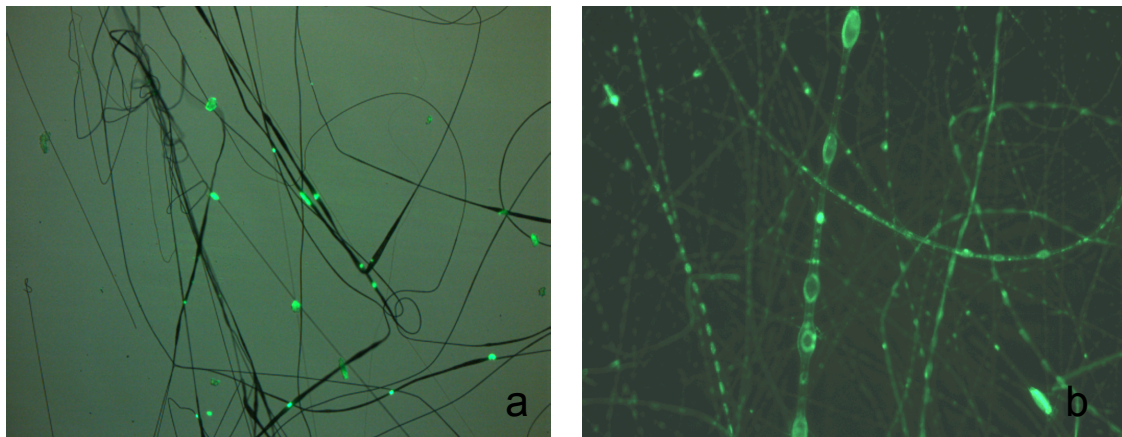


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der FITC-gekoppelten cRGD-Sequenzen: **(a)** PLLA-cRGD (s), **(b)** PLLA-cRGD (d) in 63facher Vergrößerung

Zur Quantifizierung der hydrophoben Eigenschaften wird der Wasserkontaktwinkel der Fasern angegeben. Je größer der Kontaktwinkel ausfällt, desto größer sind die hydrophoben Eigenschaften der Scaffolds.

Die gemessenen Kontaktwinkel (Abb. 15) unterschieden sich nicht innerhalb der verschiedenen Fasertypen. Rückschließend lässt sich keine Zu- oder Abnahme der hydrophoben Eigenschaften durch die RGD-Sequenz Zugabe feststellen.

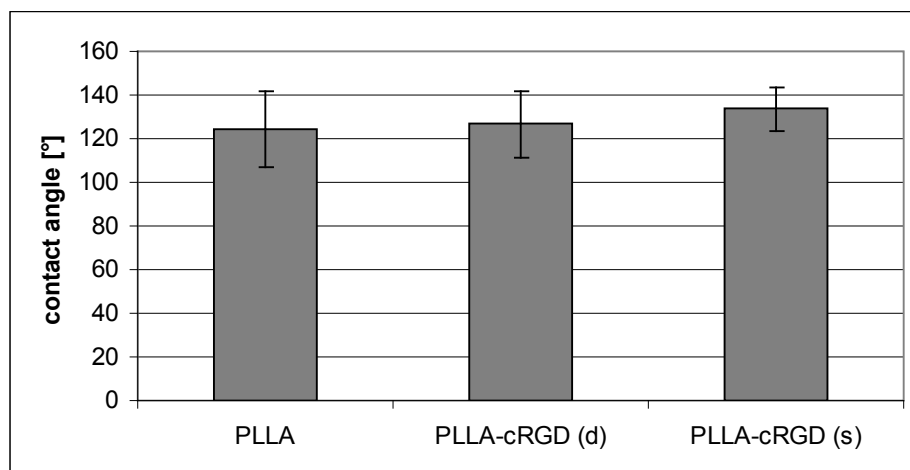


Abbildung 15: Hydrophilieeigenschaften der PLLA-Fasern als Angabe des Wasserkontaktwinkels

4.2.2 Adhäsion, Wachstum und Proliferation der hMSC auf Nanofasern

Die hMSC wurden mit einer Dichte von 12500 Zellen/Deckglas auf den Scaffolds ausgesät und über eine Dauer von 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Proben mit 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Methanol-Aceton-Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung der Zellkerne mittels Dapi. Die Auszählung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop innerhalb von 3 Gesichtsfeldern.

Während der 4 stündigen Inkubationszeit adhärten signifikant mehr Zellen auf den PLLA-cRGD (d) Scaffolds als auf den PLLA-Fasern oder den PLLA-cRGD (s) Scaffolds (Abb. 16).

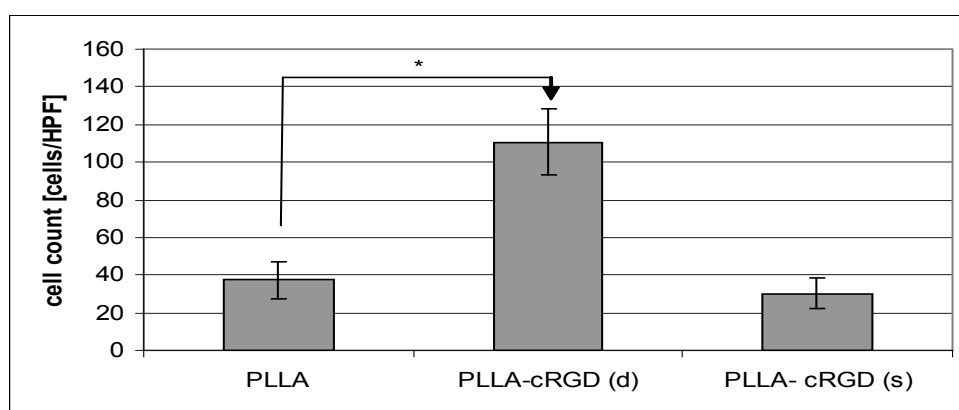


Abbildung 16: Einfluss der cRGD-Sequenzen auf Adhäsion der hMSC nach 4h. Signifikanter Anstieg der Zellzahl bei PLLA-cRGD (d)-Fasern.

Für die Beobachtung des Wachstums, der Proliferation und der Matrixformation wurde ein Versuch von insgesamt 22 Tagen Dauer angesetzt und wie auch im oben genannten Versuch erfolgten Probenentnahmen an Tag 4, 10 und 22 mit rt-PCR und Ki67- und Dapi-Immunfluoreszenzfärbung, rt-PCR und abschließend rt-PCR und Kollagen, Dapi und Osteocalcin Immunfluoreszenzfärbung.

Für die cRGD (d)-haltigen Fasern lies sich an Tag 4 ein Anstieg der Proliferation mittels Ki67 Färbung zeigen, welcher aber nicht als signifikant gegenüber der PLLA-Fasern sowie der PLLA-cRGD (s)-Fasern zu werten war. (Abb. 17).

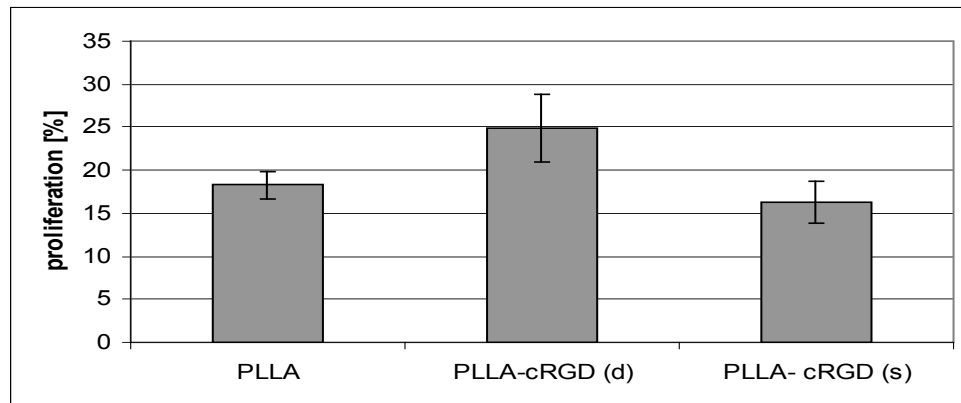


Abbildung 17: Proliferationsmessung anhand von Ki67-Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen Kultivierung.

Am Tag 22 zeigten sich jedoch die relativ höchsten Zellzahlen auf den PLLA-cRGD (s)-haltigen Fasern bei der Dapi-Immunfluoreszenzfärbung, wohin gegen keine Unterschiede zwischen den reinen PLLA-Fasern und den PLLA-cRGD (d)-Fasern zu verzeichnen waren (Abb. 18).

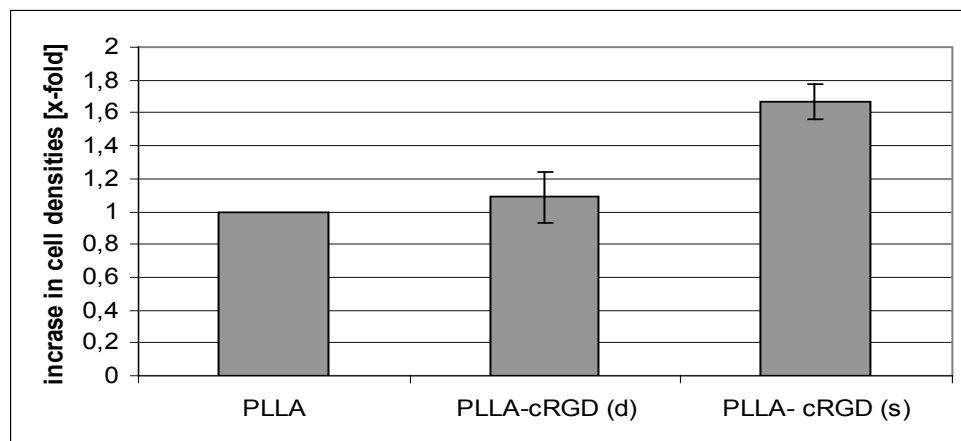


Abbildung 18: Zellzahl am Tag 22 auf PLLA, cRGD (d)- und cRGD (s)-haltigen Fasern

4.2.3 Matrixformation

Um den Einfluss der cRGD-Sequenzen auf die Differenzierung von hMSC und die Formation der Matrix zeigen zu können, wurde die Genexpression von Kollagen I (COLI) und Osteocalcin (OC) als Differenzierungsmarker auf allen Fasertypen mittels rt-PCR verglichen. Es zeigte sich bei der Inkubation von hMSC auf PLLA-cRGD (s)-Scaffolds ein tendentiell, aber nicht signifikanter

erhöhter Anstieg der Expression des Matrixproteins COLI am Versuchstag 22 wie auch des OC mit Anstiegen bereits an Tag 10 (Abb.19a und b). Die Vergleichsgruppe von PLLA-Fasern und auch die cRGD-haltigen (d) Fasern zeigten keine wesentlichen Unterschiede oder Anstiege dieser Genexpressionen.

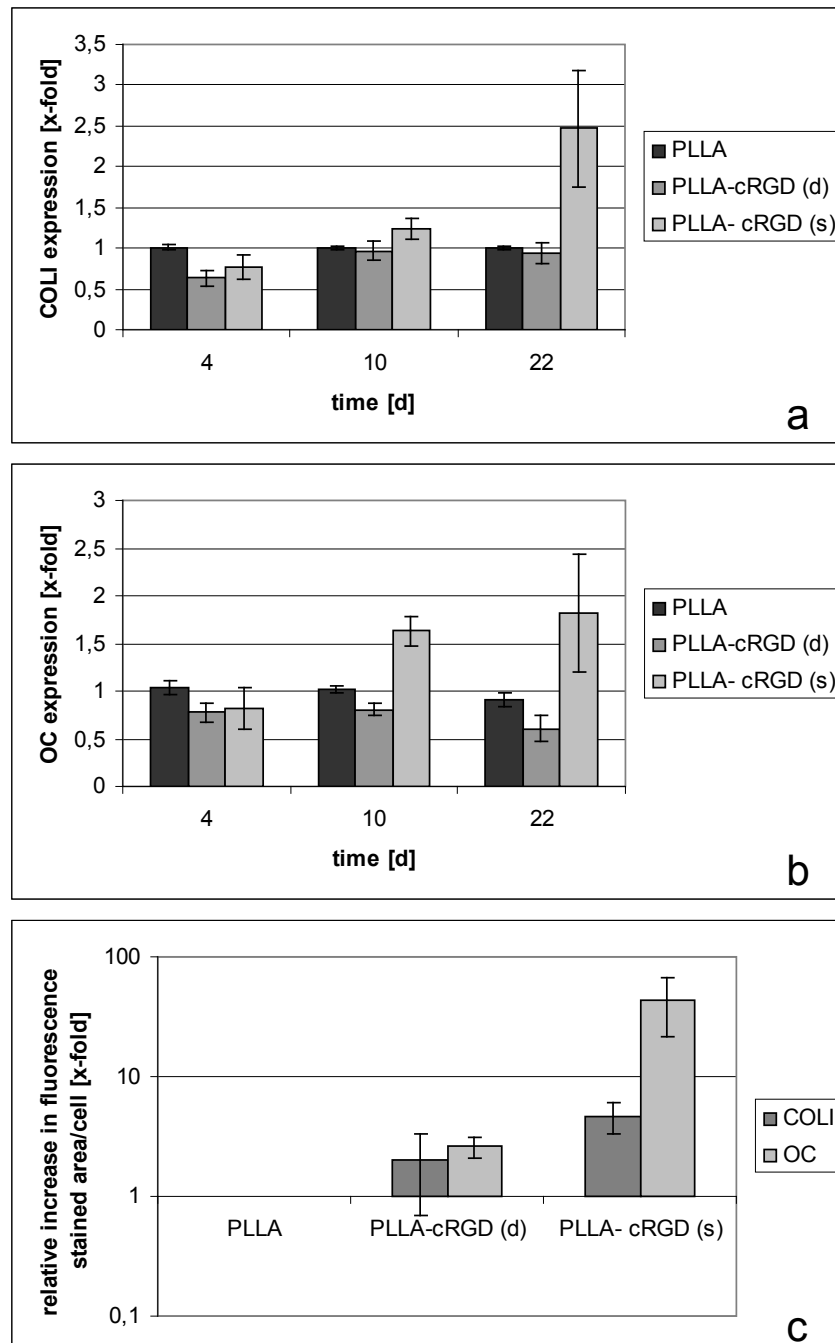


Abbildung 19: Einfluss von cRGD-Sequenzen auf die Genexpression und Produktion von COLI und OC von hMSC. Genexpression von COLI (a) und OC (b) im Zeitverlauf auf PLLA-, PLLA-cRGD (d)- und PLLA-cRGD (s)-Nanofasern. Quantitative Bestimmung von COLI und OC auf PLLA, PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s) bis zum Versuchsende an Tag 22 (c).

Abb. 19 c zeigt die Immunfluoreszenzauswertung, wobei sich hier für die PLLA-cRGD (s)-haltigen Zellen die tendentiellen Anstiege für OC und COLI nachweisen ließen, welche aber ebenfalls nicht als signifikant zu werten waren. PLLA-cRGD (d)-haltige Scaffolds führten nur zu einem minimalen Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der Vergleichsgruppe von PLLA-Fasern.

Abb. 20 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung der hMSC am Tag 22 mit Darstellung des rotgefärbten COLI für cRGD (s)-haltigen PLLA-Nanofasern und deutlich weniger COLI-Produktion auf den cRGD (d)-haltigen Fasern.

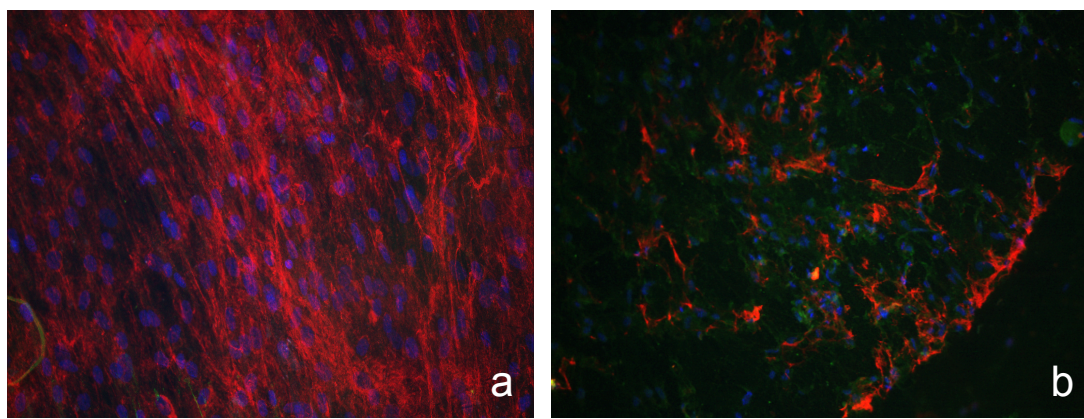


Abbildung 20: hMSC auf PLLA-Nanofasern an Tag 22 nach COLI- (rot) und OC-Immunfluoreszenzfärbung (grün): (a) PLLA-Fasern mit cRGD(s), (b) PLLA-Fasern mit cRGD(d) in 20facher Vergrößerung

4.3 cRGD-Oberflächenkopplung mittels Plasmabehandlung von PLLA-Nanofasern

Um die eingesetzten cRGD-Sequenzen zur besseren Verfügbarkeit zur Zellkopplung auf der Oberfläche der Nanofasern nachzuweisen, wurde nach einem Verfahren gesucht, welches die Aminosäuren auf die Oberfläche koppelt ohne die Fasereigenschaften zu verändern. Dafür wurde das Verfahren der Plasmabehandlung ausgewählt und die Kopplungsreagenzien EDC und sulfoNHS verwandt.

4.3.1 Fasercharakterisierung

Um funktionelle Gruppen auf den PLLA-Faseroberflächen zu akquirieren, wurden die Scaffolds unterschiedlich lange mit Sauerstoff-Plasma behandelt. Um dabei keine Veränderung der Faseroberfläche zu erzeugen, wurde unter Verminderung der Luftfeuchtigkeit (<15%) gearbeitet. Abb. 21 zeigt die Fasern im Elektronenmikroskop vor und nach 5 minütiger Plasmabehandlung.

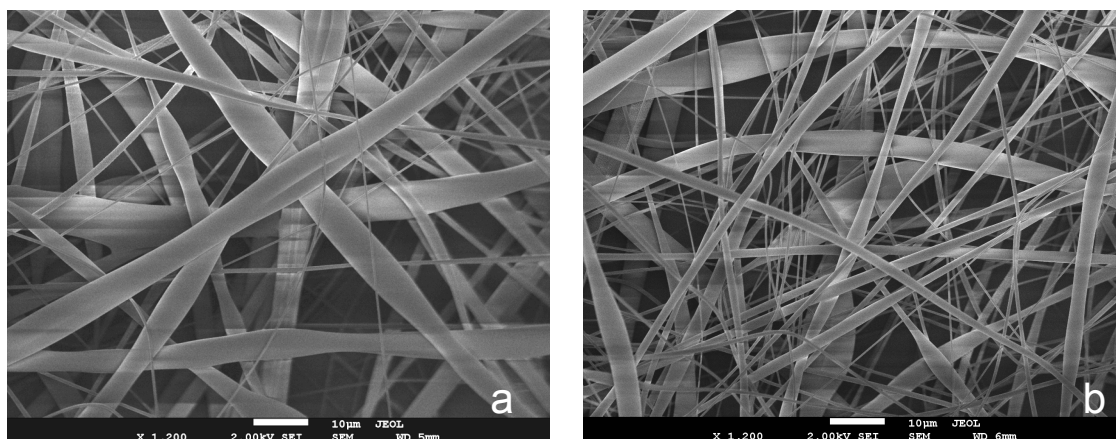


Abbildung 21: Einfluss der Plasmabehandlung auf die PLLA-Nanofaser: **a)** PLLA-Faser ohne Plasmabehandlung, **b)** PLLA-Faser nach 5 min Plasmabehandlung

Während der Plasmabehandlung kam es zu einer Verminderung der Kontaktwinkel der Nanofasern. Nach 1 Minute der Behandlung erfolgte zunächst ein leichter Anstieg mit nachfolgender Abnahme des Kontaktwinkels um wenige Grad, bei zunehmender Behandlungsdauer von bis zu 5 Minuten (Abb. 22).

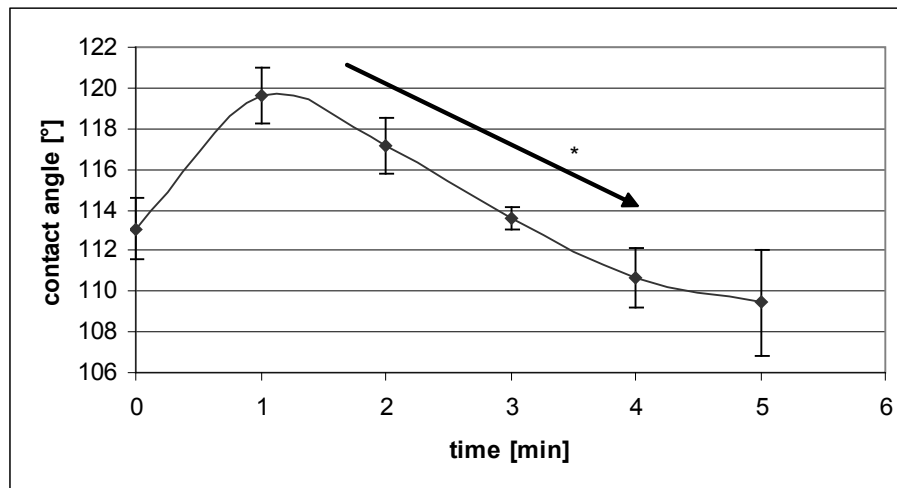


Abbildung 22: Kontaktwinkelabnahme im Zeitverlauf der Plasmabehandlung

Die plasmabehandelten Fasern zeigten im Vergleich zu den nicht behandelten PLLA-Fasern eine signifikant geringere Fasermaximalbelastung ($p=0.001$ und $p=0.000$) (Abb. 23). Die Reißfestigkeit der Fasern nimmt unter zunehmender Plasmabehandlung insbesondere bei 5 minütiger Behandlung deutlich ab.

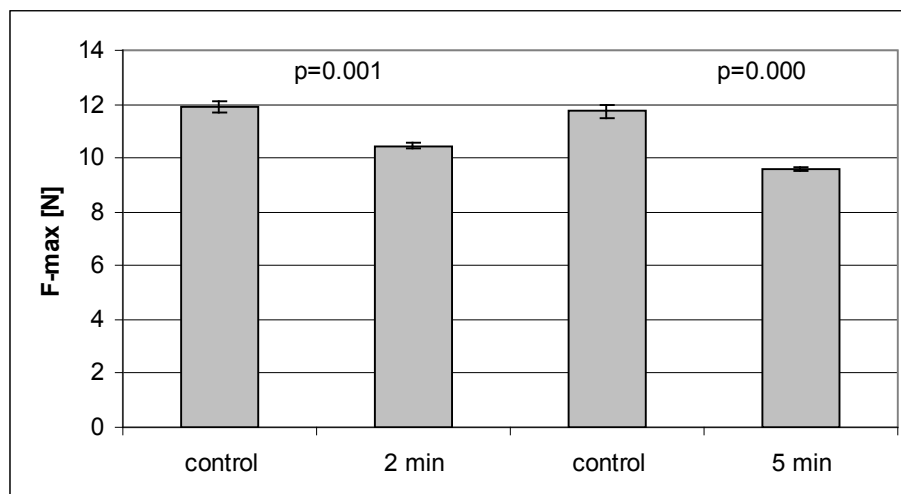


Abbildung 23: Signifikante Abnahme der möglichen Maximalbelastung der Faser nach 2 minütiger und 5 minütiger Plasmabehandlung.

Trotz der Abnahme der Maximalbelastung ließ sich unter standardisierten Versuchsbedingungen kein Nachweis der Faserinstabilität feststellen. Die Scaffolds blieben über 22 Versuchstage stabil und wiesen keine Defekte im Scaffold-Netz im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Steifigkeit bzw. Elastizität der Faser blieben durch die Plasmabehandlung unbeeinflusst (Abb. 24).

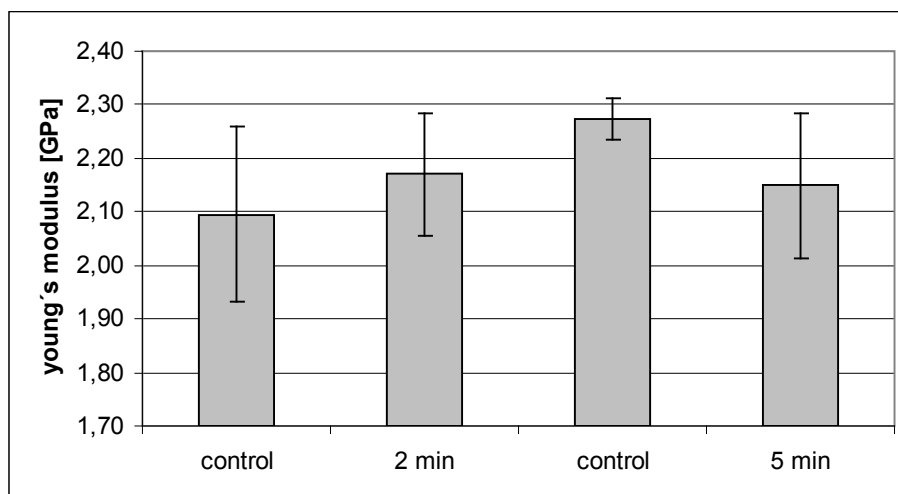


Abbildung 24: Elastizität der Fasern nach 2 minütiger und 5 minütiger Plasmabehandlung

Ebenfalls entscheidend zur Beurteilung der strukturellen Veränderung der Fasern war der Einfluss auf den Faserdurchmesser durch die Plasmabehandlung, der bei elektronenmikroskopischen Messungen keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe zeigte (Abb. 25).

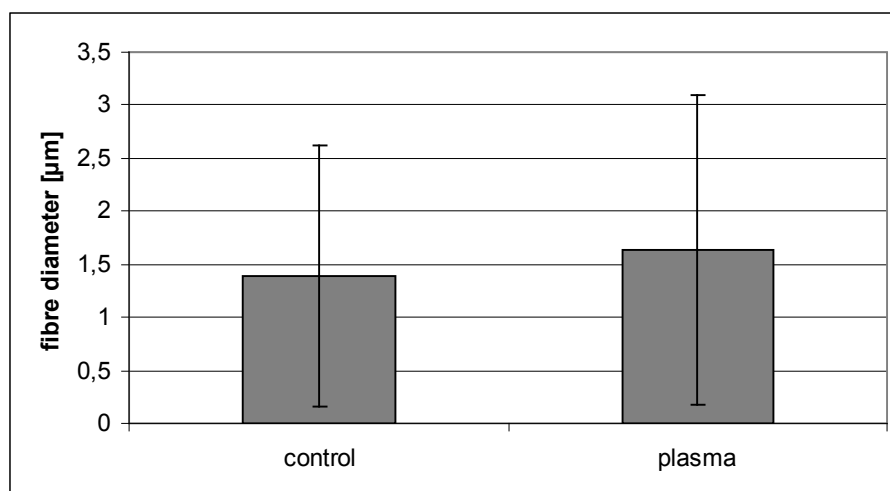


Abbildung 25: Keine signifikante Veränderung des PLLA-Faserdurchmessers nach Plasmabehandlung

Nach der Plasmabehandlung erfolgte die Kopplungsreaktion mittels EDC, NHS und den cRGD-Sequenzen (siehe auch Abschnitt 3.2.11).

Zum Nachweis der gekoppelten cRGD-Sequenzen auf den plasmaaktivierten und unter Einfluss von EDC und sulfo-NHS stehenden PLLA-Fasern wurde fluoreszierendes FITC-gebundenes cRGD verwandt. Dabei wurde die cRGD-Bindung bei rein plasmaaktivierten Fasern, EDC oder sulfo-NHS behandelten Fasern sowie bei EDC und sulfo-NHS behandelten Fasern untersucht. Die höchste Fluoreszenz des FITC, also Bindung des cRGD, zeigte sich unter Behandlung der plasmaaktivierten PLLA-Faser mit sulfo-NHS- und EDC-Behandlung (Abb.26, Abb.27 und Abb.28) im Fluoreszenzmikroskop. Für die reinen PLLA-Fasern oder auch plasmaaktivierten Fasern zeigte sich keine signifikant erhöhte Fluoreszenz (Abb. 26) nach durchgeführter Kopplungsreaktion mit FITC-RGD.

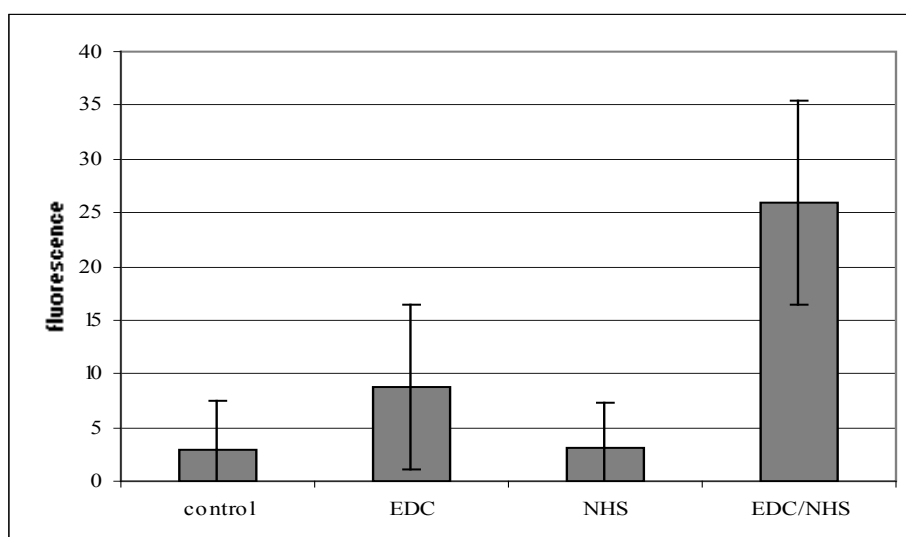


Abbildung 26: Quantitative Fluoreszenzmessung der PLLA Fasern in der Kontrollgruppe, plasmabehandelten Fasern mit EDC, plasmabehandelten Fasern mit NHS und plasmabehandelten Fasern mit EDC+NHS

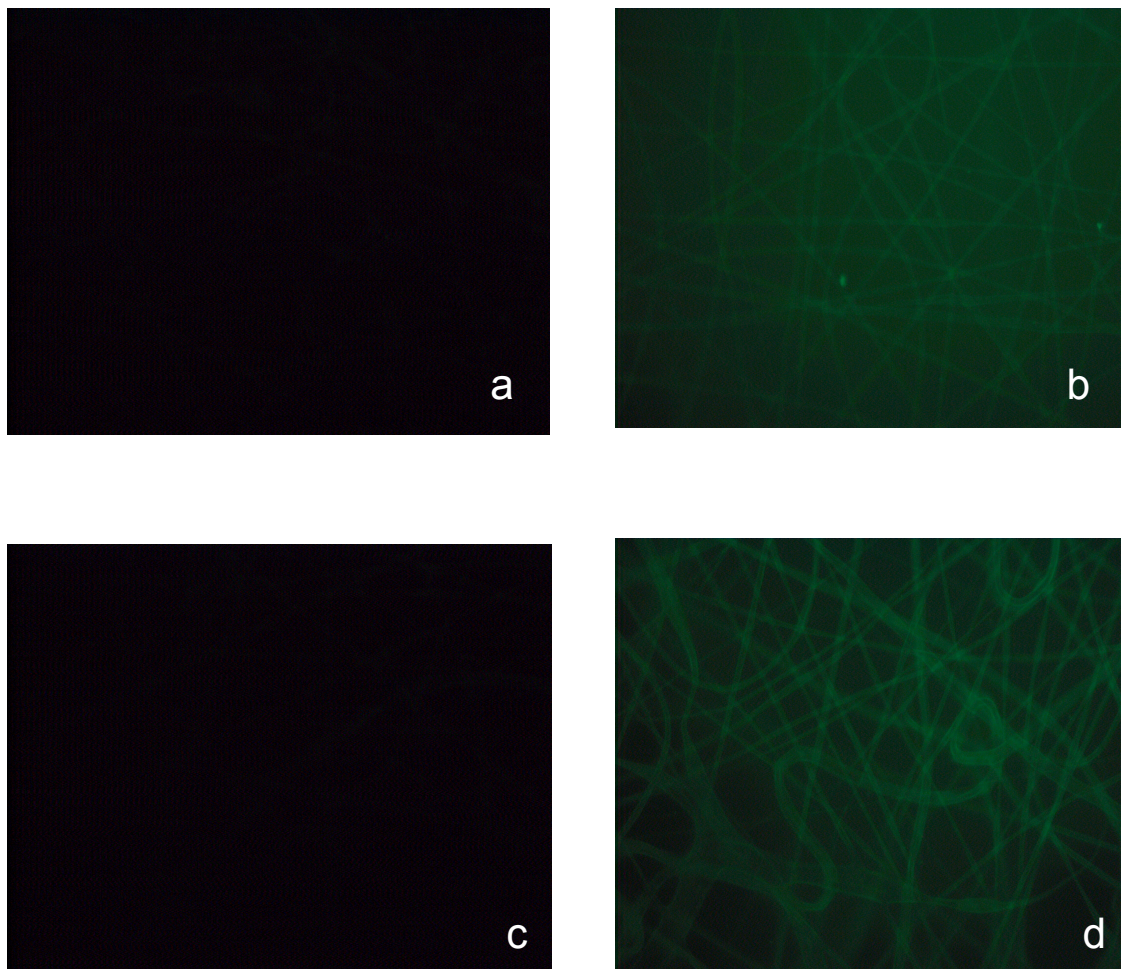


Abbildung 27: Darstellung der Fasern unter Fluoreszenzlicht mit FITC-gekoppelten cRGD-Sequenzen: Plasmabehandelte Fasern (a), plasmabehandelte Fasern mit EDC (b), plasmabehandelte Fasern mit NHS (c) und plasmabehandelte Fasern mit EDC+NHS (d) in 20facher Vergrößerung

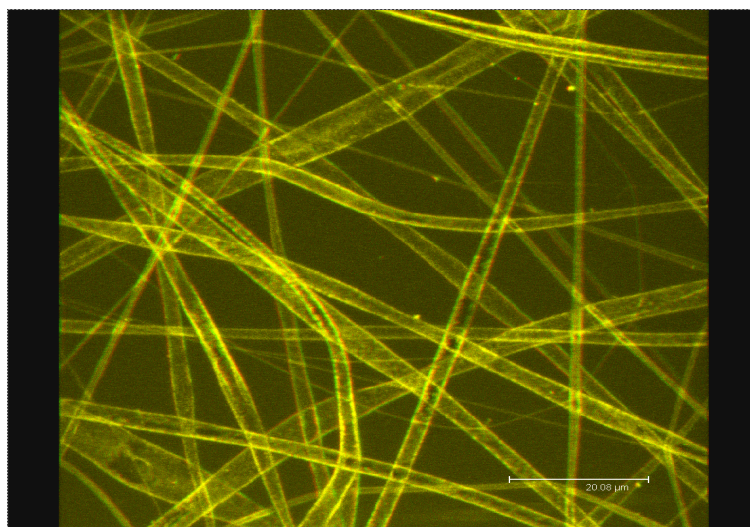


Abbildung 28: Konfokalmikroskopie der plasmabehandelten PLLA-Fasern mit EDC und NHS Behandlung sowie cRGD-Kopplung

4.3.2 Wachstum und Proliferation von hMSC auf plasmabehandelten Nanofasern

Zur Beurteilung der biologischen Effekte von oberflächengekoppelten cRGD-Sequenzen beobachteten wir das Zellwachstum und die Differenzierung der hMSC. Das Verhalten der hMSC wurde unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 12500 Zellen/Deckglas auf die Scaffolds ausgesät und über einen Zeitraum von 22 Tagen inkubiert. Probenentnahmen fanden an Tag 4 mit rt-PCR und Ki 67-Immunfluoreszenzfärbungen, an Tag 10 mit rt-PCR und an Tag 22 mit rt-PCR, COLI- und OC-Immunfluoreszenzfärbungen statt. Es zeigten sich während dieser Zeit keine signifikanten Unterschiede in der Zelldichte, ob auf PLLA-Fasern, plasmabehandelten PLLA-Fasern oder PLLA-Fasern mit gekoppelten cRGD-Sequenzen (Abb.29 und Abb.30). Die Zellzahl nahm über den Versuchszeitraum unter Wachstumsbedingungen oder osteoinduktiven Bedingungen stetig zu. Für die cRGD-haltigen Fasern lies sich ein Anstieg der Proliferationsrate gegenüber den reinen PLLA-Fasern nachweisen. Diese Anstiege waren jedoch nicht signifikant und hatten keinen Einfluss auf die Zellzahl (Abb. 30).

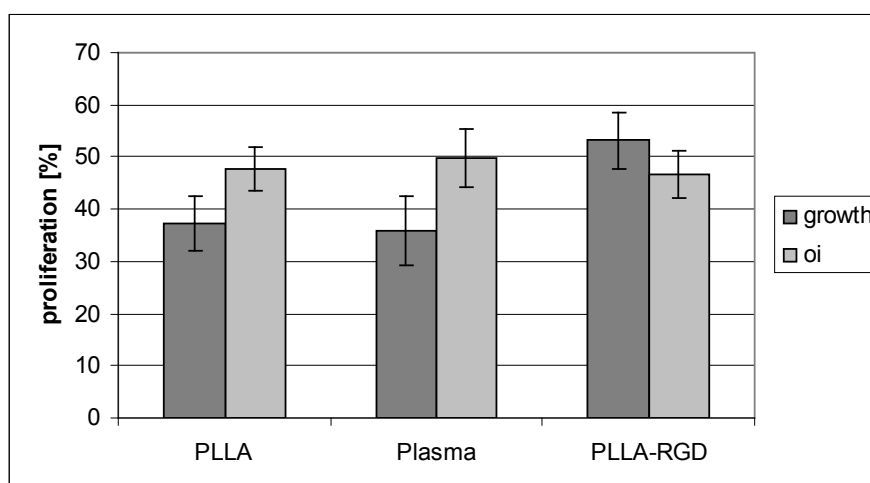


Abbildung 29: Proliferation von hMSC auf PLLA-, plasmabehandelten, und cRGD-gekoppelten Fasern unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen

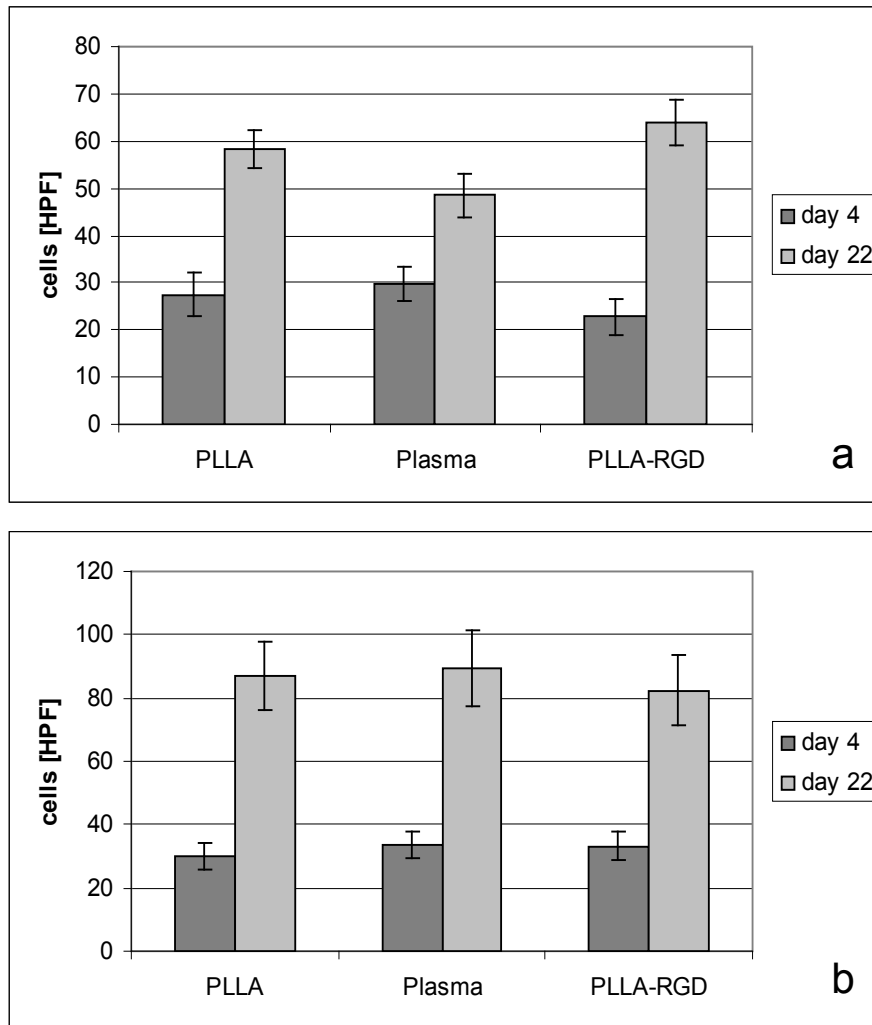


Abbildung 30: Zellzahlen auf unterschiedlichen Scaffolds an Tag 4 und 22 unter Wachstumsbedingungen (a) und osteoinduktiven Bedingungen (b)

4.3.3 Matrixformation

Die Auswirkung der gekoppelten cRGD-Sequenzen auf PLLA-Nanofasern auf Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten wurde auf PLLA-Fasern, PLLA-Fasern mit Plasmabehandlung, sowie auf cRGD-gekoppelten Fasern mittels EDC/NHS-Behandlung untersucht. Es zeigte sich in der rt-PCR auf plasmabehandelten Nanofasern sowohl unter osteoinduktiven als auch unter Wachstumsbedingungen ein Anstieg der Transkriptionsprodukte, die für osteoblastäre Differenzierung stehen (AP, OC, COLI).

Für AP und COLI waren unter wachstumsfördernden Bedingungen deutliche Anstiege an Tag 4 der plasmabehandelten Fasern zu verzeichnen. Diese waren im Verlauf an Tag 10 und Tag 22, jedoch nicht mehr gegenüber der anderen Fasergruppen darstellbar.

Die cRGD-gekoppelten Fasern boten unter wachstumsfördernden Bedingungen erst am Tag 10 eine Zunahme von AP und COLI, also deutlich später als die nur plasmabehandelten Fasern (Abb 31a und 31b). Für OC boten sich leichte Anstiege der plasmabehandelten Scaffolds über den gesamten Versuchszeitraum an Tag 4, 10 und 22, der höchste Anstieg jedoch zeigte sich an Tag 10 für die cRGD-gekoppelten Fasern (Abb. 31c).

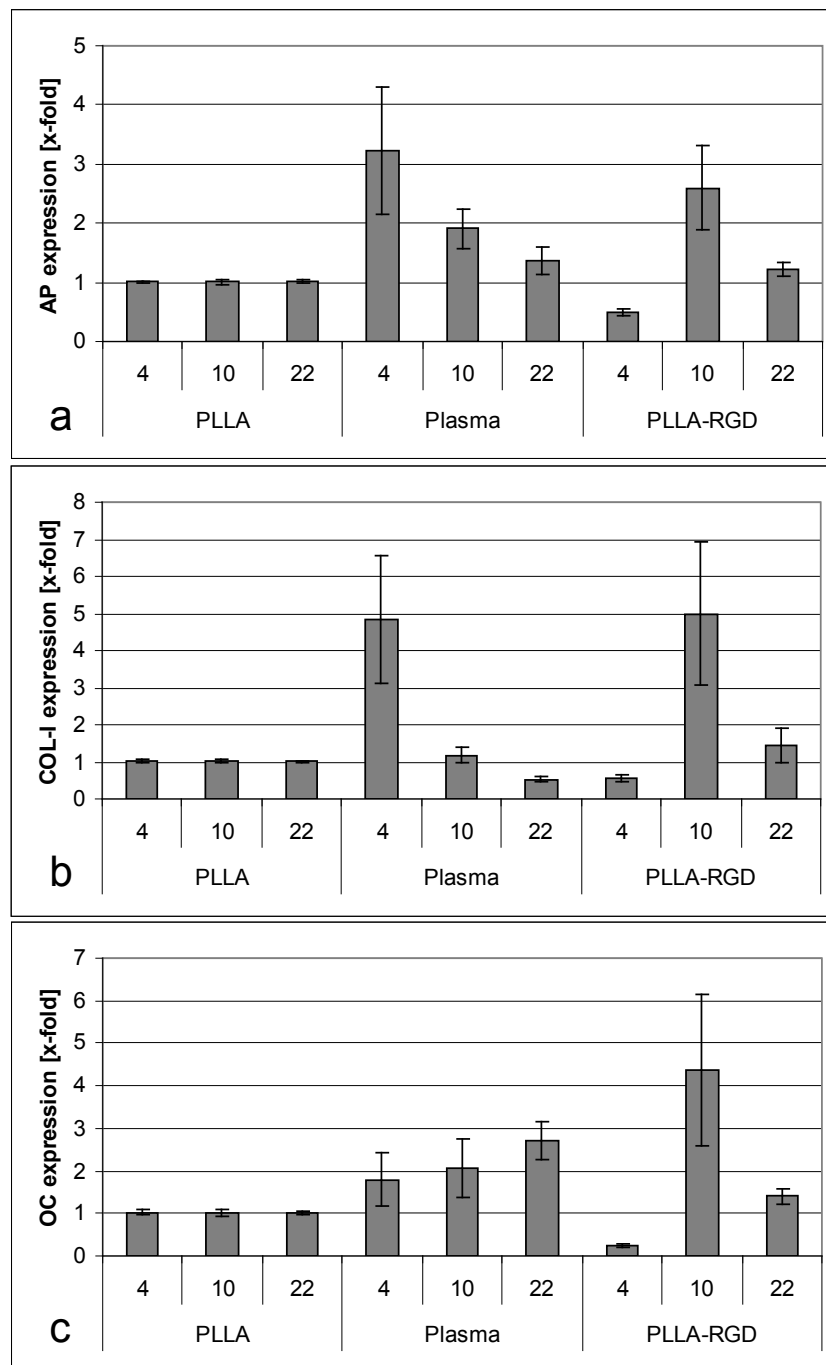


Abbildung 31: Einfluss von Plasmabehandlung und cRGD-Kopplung auf PLLA-Nanofasern auf die Genexpression unter Wachstumsbedingungen: Alkalische Phosphatase (AP) (a), KollagenI (COLI) (b) und Osteocalcin (OC) (c) jeweils an Tag 4, 10 und 22 des Versuches

Unter osteoinduktiven Bedingungen zeigten sich für die plasmabehandelten und für die cRGD-gekoppelten Fasern an Tag 10 zunächst ein Anstieg von AP, der jedoch in eine Abnahme gegenüber der Kontrollgruppe von PLLA-Fasern an Tag 22 überging (Abb. 32a).

COLI stellte sich zunächst an Tag 4 vermindert für die plasmabehandelten Fasern sowie auch für die cRGD-gekoppelten Scaffolds dar, nahm aber dann auf den cRGD-haltigen Fasern ab Tag 10 zu (Abb. 32b). Auf den plasmabehandelten Fasern blieb COLI jedoch weiterhin vermindert gegenüber der Kontrollgruppe von PLLA-Fasern.

OC bot einen deutlichen Anstieg erst an Tag 10 auf plasmabehandelten und cRGD-gekoppelten Fasern, wobei die cRGD-haltigen Fasern eine deutlich höhere Expression boten. Am Tag 22 war dies nicht mehr nachweisbar (Abb. 32c).

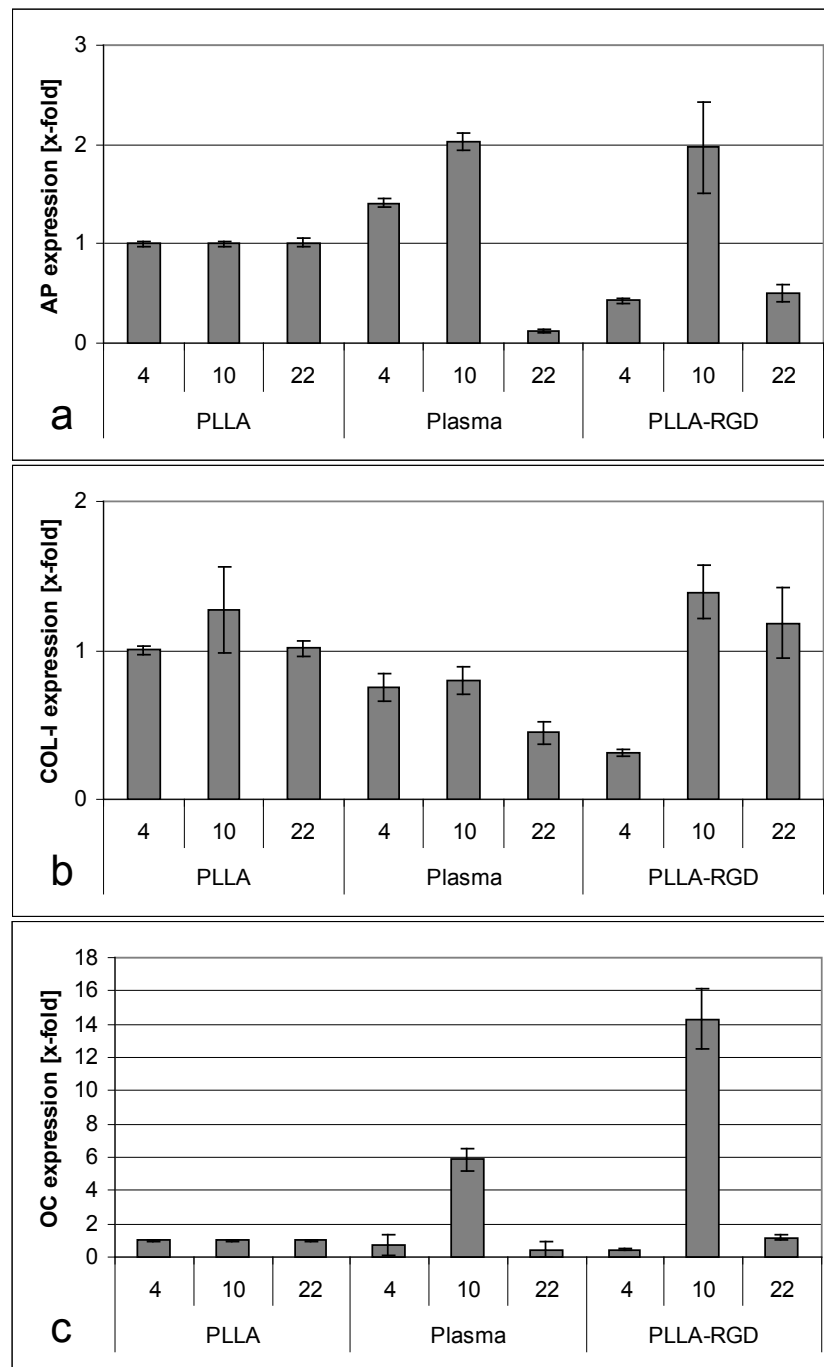


Abbildung 32: Einfluss von Plasmabehandlung und cRGD-Kopplung auf PLLA-Nanofasern auf die Genexpression unter osteoinduktiven Bedingungen: Alkalische Phosphatase (AP) (a), Kollagen I (COLI) (b) und Osteocalcin (OC) (c) jeweils an Tag 4, 10 und 22 des Versuches

5 Diskussion

Scaffolds aus Poly(L-lactid)-Nanofasern erwiesen sich in der Vergangenheit als ansprechende Matrix für das Wachstum von Osteoblasten und ihre Differenzierung aus humanen mesenchymalen Stammzellen (Boudriot et al. 2006, Boudriot et al. 2004). Allerdings zeigte sich hierbei eine Abnahme der Genexpression von osteogenen Markern im Vergleich zu Kollagen-Nanofasern. Um diesen Nachteil zu überwinden, wurden die Poly(L-lactid)-Fasern mittels bioaktiven Sequenzen des Kollagens funktionalisiert. Kollagen zeigte bereits in der Vergangenheit, dass es das Wachstums und die Differenzierung von hMSC fördert auch ohne Einbringen von osteoinduktiven Stimulantien (Shih et al. 2006, Schofer et al. 2009b). Ebenfalls gezeigt werden konnte, dass Poly(L-lactid)-Matrices mittels Kopplung (Hu et al. 2008) oder als Blend (Kim et al. 2008) mit Kollagen oder Gelatine versehen werden können. Reine Kollagenscaffolds erwiesen sich in ihren mechanischen Eigenschaften als nicht ausreichend stabil, so dass sie während der Zellkultivierung große Risse oder eine vollständige Dehiszenz aufwiesen. Somit waren sie ungeeignet für die Zellkultivierung über einen längeren Zeitraum (Schofer et al. 2009a).

Das Kollagen wirkte jedoch gegenüber dem ansonsten deutlich mechanisch stabileren PLLA überlegen in Bezug auf Zelladhäsion und Differenzierung. Für den zellstimulierenden und proadhäsiven Effekt des Kollagens ist die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat über Integrinrezeptorbindungen verantwortlich (siehe auch Punkt 2.6).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es sich den biologischen Effekt der RGD-Sequenzen zu Nutze zu machen und die Poly(L-lactid)-Nanofasern mittels der RGD-Sequenzen zu funktionalisieren, so dass diese auf der Oberfläche für die Zelladhäsion zur Verfügung stehen.

Um die RGD-Sequenzen in Verbindung mit den PLLA-Nanofasern zu bringen, wurden diese in der ersten Versuchsreihe mittels Suspension in die Poly(L-lactid)-Lösung eingebracht (siehe auch Punkt 3.2.9). Da in vorherigen Arbeiten von Kim et al. bereits gezeigt werden konnte, dass sich hydrophile Gruppen

beim Spinnprozess auf der Oberfläche der Nanofasern ansiedeln (Kim et al. 2004), konnte angenommen werden, dass dies auch bei den RGD-Sequenzen mit ihren funktionellen hydrophilen Gruppen geschehen müsste. Die große Oberfläche und die porenartige Struktur, welche die Poly(L-lactid)-Nanofasern bieten, sollten den hMSC bei der Kultivierung einen ausreichenden Kontakt zu den integrinbindenden RGD-Sequenzen in der PLLA-Faser ermöglichen.

Ausszuschließen war nicht, dass additive Substanzen in der Poly(L-lactid)-Lösung die Eigenschaften der Fasern und deren Morphologie grundlegend verändern könnten. Es galt also zu vermeiden, dass der Zusatz von RGD-Sequenzen die Faserstruktur verändert um keine Veränderung des Zellverhaltens durch die mechanischen und strukturellen Gegebenheiten der Faser zu induzieren.

Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich eine leichte Abnahme des Faserdurchmessers, welche aber als nicht signifikant zu werten war (Abb.13). Auch die Kontaktwinkel als Maßeinheit für die hydrophoben Eigenschaften der RGD-haltigen Fasern unterschieden sich nicht signifikant von denen der reinen Poly(L-lactid)-Fasern. Somit scheint eine strukturelle Einflussnahme auf die Fasercharakteristik durch die Zugabe der RGD-Sequenzen zur Polymerlösung in unseren Versuchen unwahrscheinlich.

5.1 Inkorporation von RGD-Sequenzen mittels Suspension – PLLA-cRGD (s) und PLLA-linRGD (s)

Für den Vergleich zwischen der Wirksamkeit der linear angeordneten RGD-Sequenzen sowie ihrer zyklischen Variante wurden diese jeweils mittels Suspension in die Polymerlösung eingearbeitet und versponnen.

Nach 4h zeigte sich keine signifikant höhere Adhäsion auf den RGD-haltigen Fasern. Jedoch ließ sich für beide Gruppen, sowohl für die linRGD-haltigen als auch für die cRGD-haltigen Fasern die Tendenz zur vermehrten Zellansiedelung nachweisen im Vergleich zu den nur aus PLLA bestehenden Fasern. Dieser Effekt der verbesserten Adhäsion durch RGD fand sich auch in anderen Arbeitsgruppen (Chollet et al. 2009, Akdemir et al. 2008). Akdemir et al. konnten eine erhöhte Osteoblastenadhäsion und eine vermehrte Produktion

von Calcium auf RGD-haltigen Oberflächen nachweisen. Bei Versuchen zur Verbesserung der Zelladhäsion auf Titanoberflächen, wiesen Düwelhenke et al. darauf hin, dass das Aufbringen von RGD-Sequenzen in zyklischer Variation auf die Oberfläche bei jeder Art von Titan, unabhängig von der Rauigkeit des Grundmaterials, die Zelladhäsion von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten um 40% zu steigern vermag (Düwelhenke, Bierbaum and Eysel 2007). Ebenfalls erhöhte Adhäsionen von Mausosteoblasten ließen sich auf cRGD- und linRGD-haltigen Oberflächen aufweisen (Kaufmann et al. 2008). Hier konnte nach 24stündiger Zellkultivierung eine Überlegenheit des cRGD gegenüber der linearen Form nachgewiesen werden. Eine Signifikanz stellte sich in der vorliegenden Arbeit nicht dar. Jedoch umfasste die Adhäsionsphase, um die frühe Phase der Zellreaktion zu beurteilen, die ersten 4 h nach Besiedelung der Scaffolds. Der in dieser Arbeit kürzere gewählte Zeitraum könnte die mangelnde Signifikanz der Ergebnisse erklären. Zu bemerken sei allerdings, dass sich auch in den durchgeführten Versuchen die Tendenz zur vermehrten Adhäsion der hMSC auf den RGD-haltigen Fasern, unabhängig in welcher Konformation diese vorlagen, zeigte.

Über die längere Kultivierungszeit von 22 Tagen zeigte sich für die cRGD-haltigen Fasern eine deutliche Erhöhung der Kollagen-I-Genexpression, welche für die beginnende Ausdifferenzierung der hMSC zu Osteoblasten und somit den Beginn der Knochenmatrixproduktion spricht. Da Kaufmann et al. schon für die 24stündige Adhäsion eine Überlegenheit der zyklischen Variante beweisen konnten (Kaufmann et al. 2008), ist davon auszugehen, dass die zyklische Variante gegenüber der linearen RGD-Variante ein erhöhtes Zellfeedback über die Integrinrezeptoren bedingt. Auch Hsiong et al. konnten nachweisen, dass lineare RGD-Formen zwar die Differenzierung von Preosteoblasten vermitteln, aber keinen Effekt auf die Differenzierung von humanen Knochenmarksstammzellen oder D1 Stammzellen haben (Hsiong et al. 2009). Die zyklische RGD-Variante brachte auch Osteoprogenitorzellen in die Differenzierung. Genau dies zeigten auch die Genexpressionsanalysen der cRGD-haltigen Fasern an Tag 22 in Form der erhöhten Kollagen-I-Produktion, wohingegen sich keine vermehrte Differenzierung der hMSC auf den mit linearen Sequenzen versehenen Scaffolds nachweisen ließ.

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse und die in der Literatur verzeichneten Ergebnisse zeigen einen positiven Effekt der RGD-Sequenzen auf Adhäsion und Wachstum der hMSC. In den Arbeiten von Kaufmann et al. wie auch in den beschriebenen Versuchen konnte die Überlegenheit der zyklischen Sequenzfolge dargestellt werden, so dass bei den Folgeversuchen nur noch die zyklische Variante der Aminosäuresequenz verwendet wurde.

5.2 cRGD-Inkorporation in PLLA-Nanofasern mittels Emulsion und Suspension – PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s)

Während des Suspensionsversuches zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Zelladhäsion nach 4stündiger Inkubation. Um den adhäsiven Effekt der RGD-Sequenzen auch nach kurzer Inkubationszeit zu generieren, wurden Strategien entwickelt, um eine möglichst hohe Anzahl von Sequenzen auf der Oberfläche der PLLA-Nanofasern zu schaffen.

Dafür wurde die Einbringung der zyklischen RGD-Sequenzen über Suspension mit der über Emulsion verglichen. In der Suspension fanden sich trotz Ultraschallbadbehandlung noch akkumulierte RGD-Sequenz-Anreicherungen (siehe Punkt 4.2.1 und Abb.14). Da sich die pulvrig vorliegenden RGD-Sequenzen bei Lösung in destilliertem Wasser leichter lösten, wurde eine bessere Verteilung der Sequenzen bei anschließender Zugabe des Wasser-RGD-Gemisches in die Poly(L-lactid)-Lösung angenommen.

Es blieb zu überprüfen, inwieweit das Emulsionsverfahren eine Veränderung der mechanischen Nanofasereigenschaften verursacht. Bei beiden Verfahren verringerte sich der Faserdurchmesser nur minimal ohne statistisch signifikante Effekte. Der von uns nachgewiesene Kontaktwinkel von $124,3^\circ \pm 17,6^\circ$ findet sich in der Literatur in ähnlicher Höhe von $135,95^\circ \pm 3^\circ$ (Ravichandran et al. 2012). Die Kontaktwinkel, als deskriptiver Faktor für die hydrophoben Eigenschaften der Faser, welche eine Kultivierung im Flüssigmedium erschweren könnten, wurden nicht wesentlich beeinflusst. Die Fasercharakteristik in ihren mechanischen und physikalischen Eigenschaften

wurde also durch beide Verfahren nicht signifikant beeinflusst und kann mit der Kontrollgruppe der reinen Poly(L-lactid)-Scaffolds direkt verglichen werden.

Auf der Abbildung 14 a) und 14 b) ist erkennbar, dass die Verteilung der FITC-gekoppelten Sequenzen in der Einbringung mittels Suspension sehr fokal stattfindet und nur wenige Bereiche fluoreszieren. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die RGD-Sequenzen akkumuliert in den Fasern vorliegen und sich in der Suspension trotz Behandlung im Ultraschallbad nicht ausreichend verteilen.

Wie hoch diese Konzentration des RGD für eine ausreichende Verteilung in der Faser sein muss, ließ sich im Rahmen dieser Versuche nicht feststellen, da es nicht möglich war ein geeignetes durchführbares Verfahren zu finden, welches so geringe Mengen der Aminosäureketten quantifizieren kann. In der Literatur lassen sich jedoch einige Analysen zu RGD-Konzentrationsangaben finden, welche Effekte auf die Zellentwicklung bedingen (Rezania and Healy 2000, Yang et al. 2005).

Nach der FITC-RGD Anfärbung lässt sich jedoch vermuten, dass unter dem Emulsionsverfahren mehr RGD-Sequenzen auf der Oberfläche zur Verfügung stehen und damit eine erhöhte Adhäsion der Zellen auf der Faseroberfläche möglich ist.

Nach Beobachtung der Zelldichte über einen längeren Versuchszeitraum, in der vorliegenden Arbeit über 22 Tage hinweg, erzielten die cRGD (d)-haltigen Fasern keine signifikant höheren Zellzahlen im Vergleich mit den cRGD (s)-haltigen Fasern (siehe Abb.18). Die proadhäsiven Eigenschaften haben kurzzeitig einen Einfluss und beschleunigen die Adhäsion, erhöhen aber nicht die Proliferation der hMSC. In der Literatur lassen sich so gut wie keine Arbeiten für das Proliferationsverhalten über ähnlich lange Zeiträume hinweg finden (Bosetti et al. 2013).

Für die gesteigerte Differenzierung der Zellen erbrachten die cRGD-Sequenzen einen positiven Effekt. Dieser stellte sich jedoch nicht als signifikant dar, sondern zeigte einen Anstieg für die Differenzierungsmarker

OC (an Tag 10) und COLI (an Tag 22) für die cRGD (s)-haltigen Fasern. Auch in der Immunfluoreszenz ließ sich diese Tendenz zeigen (Abb.19 und Abb.20). Wie auch in diesen Versuchsreihen konnten bezüglich der Differenzierung der hMSC auch Song et al. in ihren Arbeiten zeigen, dass die RGD-Sequenzen die Differenzierung von Stammzellen des Knochenmarks beschleunigen (Song et al. 2009). Ebenso wiesen Li et al. nach, dass die auf der Oberfläche eines Kopolymer immobilisierten RGD-Sequenzen die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach einer Kultivierung von 14 Tagen hoch regulieren (Li et al. 2009). Bisher haben wenige Arbeitsgruppen Daten dazu erhoben inwieweit sich die linearen und die zyklischen Formen auf die Differenzierung unterscheiden. Hauptsächlich untersucht wurde nur die Wirkung auf die Adhäsion. Während der durchgeführten Versuche ergaben sich keine signifikanten Steigerungen der Differenzierung. Möglich wäre, dass während des Einbringens der RGD-Sequenzen diese Schaden genommen haben. Im Falle der Herstellung der Suspension könnte das Ultraschallbad die Aminosäuresequenzen zu einem Teil beschädigt und somit funktionsuntüchtig gemacht haben. Im Falle der Emulsion stellt sich die Frage, welche Konzentrationen gewählt werden müssen um einen Effekt signifikant zu erheben und über 22 Tage darstellen zu können. Mit den FITC-gekoppelten RGD-Sequenzen ließ sich zwar beweisen, dass sich RGD-Sequenzen in den Fasern befinden, jedoch nicht in welcher Konzentration diese Vorliegen und welche Konzentration notwendig ist um den hMSC den optimalen Stimulus der Integrinrezeptoren zu liefern.

5.3 cRGD-Oberflächenkopplung mittels Plasmabehandlung von PLLA-Nanofasern

Während der Einbringungsverfahren der RGD-Sequenzen mittels Suspension oder Emulsion ist die Hypothese, dass sich einige Sequenzen auf der Oberfläche befinden. Es lässt sich jedoch nicht genau bestimmen, wie hoch die Konzentration quantitativ ist. Ein erheblicher Teil an Sequenzen steht in der Faser zur Bindung an die hMSC nicht zur Verfügung. So entstand die Überlegung, die Sequenzen direkt auf der Oberfläche zu koppeln.

Für die Kopplung stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. In der Literatur lassen sich unterschiedliche Methoden finden.

Jabbari et al. brachten beispielsweise mit Hilfe eines Glycin-Ankers RGD-Sequenzen auf einen Poly(lactide-co-glycolide)-Scaffold kurz auch PLGA genannt (Jabbari et al. 2009). Bindungsstelle des RGD war in diesem Falle die Aminosäure Arginin. Dabei konnten Jabbari et al. zeigen, dass sowohl die Zelladhäsion als auch die Expression von Differenzierungsmarkern hoch reguliert wurde. Andere Arbeitsgruppen konnten die Zelladhäsion von Endothelzellen über die RGD-Bindung an einen Poly(ethyleneglycol) (PEG) in Form einer Amidbindung erhöhen (Choi et al. 2008).

Ho et al. verwendeten zur Kopplung der RGD-Sequenzen auf ihren PLLA-Filmen die Plasmaaktivierung (Ho et al. 2006). Dieses Verfahren dient der Aktivierung von freien Radikalen auf der Oberfläche (Wu et al. 2010), welche anschließend für Bindungsreaktionen zur Verfügung stehen. Die freien Bindungen finden hauptsächlich an den nach der Plasmabehandlung freien Carboxylgruppen statt.

Da die Plasmabehandlung die Oberfläche der Fasern verändert, wurden diese auf Reißfestigkeit, Veränderungen in ihrem Durchmesser und Veränderung der Kontaktwinkelweite bzw. ihrer hydrophilen Eigenschaften hin überprüft.

In der Literatur wird beschrieben, dass die Einwirkung der Plasmabehandlung nur bis zu 10 Nanometer tief in die Faser reicht (Baker et al. 2006, Ibnabddjalil et al. 1994). Deshalb lässt sich davon ausgehen, dass sich die Basis des Fasergerüsts nicht verändert. Die Tiefe reicht jedoch aus, um den Kontaktwinkel leicht zu verändern und auch die Reißfestigkeit der Fasern zu reduzieren. Jedoch rissen die Fasern bei geringer Plasmabehandlungszeit von ca. einer Minute unter Zugkräften, die unter normalen Versuchsbedingungen *in vitro* nicht auf sie einwirkten (siehe Punkt 4.3.1 und Abb. 23). So ist die mechanische Stabilität unter normalen Labor- und Kultivierungsbedingungen weiterhin gewährleistet. Die veränderten Kontaktwinkel bewirkten eine Verminderung der Hydrophobie, so dass die Fasern leichter im Flüssigmedium zu kultivieren waren (siehe Abb. 22). Die Verminderung der Hydrophobie von Nanofasernetzen bei der Plasmaaktivierung konnten auch Martins et al. darstellen (Martins et al. 2009). Für die Zellkultivierung mit Flüssigmedium stellt sich dieser Effekt prinzipiell als Vorteil dar.

Ho et al. verwendeten die Plasmaaktivierung ohne weitere Kopplungsreagenzien, um die Bindung der RGD-Sequenzen durchzuführen (Ho et al 2006).

Im Ergebnis zeigte sich dabei, dass alleine die Plasmabehandlung der Scaffolds die Zelladhäsion nach 24h erhöhte. Noch höher war die Zelladhäsion jedoch auf den Scaffolds die plasmaaktiviert und anschließenden RGD-Sequenz-gekoppelt wurden. Ihre Versuche wurden mittels osteoblastenähnlichen Zellen aus dem Osteosarkom der Ratte durchgeführt, welche die diskrepanten Ergebnisse zu unseren Versuchen mit hMSC erklären könnten. In unserem Fall ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Zelladhäsion oder der Zelldichte auf rein plasmabehandelten oder RGD-gekoppelten Scaffolds am Tag 4 oder auch Tag 22 des Versuchendes nachweisen. Genauso wäre es allerdings möglich, dass der Zeitraum von 4 Tagen zu weit entfernt von dem adhäsiven Effekt der Sequenzen zu Beginn der Zellkultivierung liegt. In unserem Versuch der RGD-Suspension und – Emulsion zeigte sich der Vorteil der Sequenzen auch nur innerhalb der ersten vier Stunden und nicht im weiteren Versuchsverlauf.

Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Konzentrationen der RGD-Sequenzen nicht hoch genug gewählt worden ist um die Oberflächenversorgung ausreichend zu gewährleisten und eine signifikante Erhöhung der Zelladhäsion zu erzeugen. Die Plasmaaktivierung schien in unserem Fall nicht auszureichen, um genügend RGD-Sequenzen auf der Oberfläche zu koppeln, wie die FITC-RGD-Zugabe zeigt. Hier waren die plasma- und zusätzlich mit EDC/NHS-behandelten Scaffolds allen anderen Gruppen signifikant in der FITC-RGD-Bindung überlegen (siehe Abb. 27).

Die EDC/NHS-Behandlung sollte auf der plasmaaktivierten Oberfläche die kovalente Bindung der RGD-Sequenzen ermöglichen. Die Kopplung von RGD auf Polycaprolactone mittels EDC/NHS wurde bereits von Sun et al. versucht (Sun, Wirsén and Albertsson 2004). Auch Noga et al. koppelten erfolgreich RGD-Sequenzen auf Oberflächen mittels eines EDC/NHS-Gemisches (Noga et al. 2008). Da die Verwendung von EDC zwar bereits eigenständig die Carboxylgruppen für Reaktionen aktiviert, diese aber durch Hydrolyse schnell abreagieren, ist der Zusatz von NHS notwendig. EDC/NHS aktivierte Ester sind stabiler und behindern die Reaktion mit Aminen und anderen funktionellen

Gruppen nicht. Die quantitativ höchste RGD-Bindung erfolgte auch bei uns mittels plasmaaktivierten und dann mit EDC und NHS behandelten Nanofasern. Nachweisbar war dies über fluoreszierendes RGD unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 27).

Zusammenfassend lässt sich für das Kopplungsverfahren der Plasmaaktivierung und die Behandlung mit EDC und NHS zeigen, dass es sich eignet um Proteine auf Oberflächen zu verankern.

Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich kein Vorteil für die Adhäsion bzw. das Zellwachstum im Verlauf der Kultivierung über einen längeren Zeitraum. Ähnliches konnte auch von Kim et al. berichtet werden (Kim and Park 2006).

Allerdings zeigte sich unter Wachstumsbedingungen mit Standardmedium stattdessen eine vermehrte Produktion von osteoinduktiven Genprodukten wie AP und COLI an Tag 4 auf plasmabehandelten Scaffolds (siehe Punkt 4.3.3 Abb.29). Die Zellen auf den RGD-behandelten Fasern zeigten diese Effekte erst einige Tage später an Versuchstag 10.

Für OC allerdings war die Genexpression an Tag 10 für die RGD-haltigen Scaffolds am höchsten. Die Plasmaaktivierung regt die Expression und damit die Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten frühzeitig an. Allerdings lässt sich dieser Effekt über den gesamten Versuchszeitraum von 22 Tagen nicht nachweisen.

Die RGD-Sequenzen regulieren die Genexpression der Differenzierungsmarker erst einige Tage später hoch. Insbesondere für OC ließ sich dieser Effekt darstellen. Die Plasmaaktivierung allein hatte keinen Effekt auf die OC-Genexpression.

Unter osteoinduktiven Bedingungen lässt sich kein Vorteil der Plasmaaktivierung in Bezug auf die Zelldifferenzierung zeigen. Dafür zeigt sich aber eine vermehrte OC-Expression für die RGD-Sequenzen (siehe Abb.30).

Da sich in unserem vorherigen Versuch zeigen ließ, dass die RGD-Sequenzen osteoinduktive Wirkung haben, ist hier die Frage zu stellen wieso sich dieser Effekt nur in Form von Tendenzen ohne jede Signifikanz zeigen ließ und nicht mit eindeutiger Überlegenheit der RGD-Sequenzen darzustellen war. Auch Bosetti et. al konnten in ihren Arbeiten an hMSC und RGD-haltigen PLLA Scaffolds keine Signifikanz der osteoinduktiven Wirkung nachweisen bei jedoch vermehrter Proliferation der Zellen (Bosetti et al. 2013).

Zu vermuten wäre hier, dass die Plasmaaktivierung nicht ausreichend viele Carboxylgruppen für die Kopplungsreaktion und somit eine nicht ausreichende RGD-Konzentration zur Verfügung stellt. Die Aktivierungszeit musste jedoch kurz gewählt werden, um keine großen Schädigungen der Nanofasern hervorzurufen oder das Scaffold aufzulösen.

5.4 Ausblick

Die Plasmaaktivierung samt Stabilisierung der Bindungsreaktion mittels EDC und NHS stellt einen geeigneten Mechanismus zur Bindung von Proteinen auf der Oberfläche dar. Jedoch ist es für zukünftige Versuche notwendig eine quantitative Konzentrationsbestimmung durchführen zu können, um die genaue Anzahl der RGD-Sequenzen auf der Oberfläche bestimmen zu können. Diese sollten dann zu einer Optimierung der Zelladhäsion und der Ausdifferenzierung zu Osteoblasten führen können.

Sollte dies gelingen und eine vermehrte Ausdifferenzierung auf den behandelten Materialien nachweisbar sein, wäre es wichtig in nahe gelegener Zeit die verwendeten Materialien in experimentellen *in vivo* Versuchen auf ihre klinische Eignung zu testen im Rahmen von osteogenen Defekten und deren Ausheilung.

6 Zusammenfassung

Im klinischen Alltag stellt die Versorgung von Knochendefekten bei nur geringer Verfügbarkeit des körpereigenen Materials eine große Herausforderung dar. Das Tissue Engineering bietet eine geeignete Methode zur Produktion von Knochenersatzmaterial. Hierbei wird körpereigenes Material unter Laborbedingungen (in vitro) gezüchtet und dem Organismus replantiert.

Vorausgehende Arbeiten konnten in Elektrospleinprozessen biokompatible Scaffolds aus Kollagenfasern herstellen, welche ein gutes Angehen und Differenzieren von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ermöglichten. Der Nachteil dieser Kollagen-Scaffolds lag jedoch in der geringen mechanischen Stabilität. In den Forschungsergebnissen zeigte sich, dass die osteoinduktive Wirkung von Kollagen auf eine Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginacid (RGD) zurückzuführen ist.

Ziel dieser Arbeit war es die osteoinduktive Wirkung des Kollagens mit Hilfe von RGD-Sequenzen mit den mechanisch stabileren Poly(L-lactid)Nanofasern (PLLA) zu verbinden.

Hierzu erfolgte die Zellkultivierung von hMSC über 22 Tage unter osteoinduktiven Bedingungen und Wachstumsbedingungen auf PLLA-Nanofaserscaffolds. Es wurden quantitative Bestimmungen der hMSC-Differenzierungsmarker Osteocalcin, Kollagen und Alkalischer Phosphatase über RealtimePCR und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Es wurden eine lineare und eine zyklische RGD-Sequenz miteinander verglichen sowie unterschiedliche Einbringungsverfahren der Sequenzen in die Faser untersucht. Die RGD-Sequenzen wurden mittels Suspension und mittels Emulsion in die Faser eingebracht sowie nach Plasmabehandlung des PLLA-Scaffolds und Kopplungen von EDC (1-Ethyl-3(3dimethylaminopropyl) carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) an die Oberfläche der Faser gekoppelt.

Die strukturellen Veränderungen auf die Fasereigenschaften der unterschiedlichen Behandlungsmethoden wurden mittels Elektronenmikroskopie (Beurteilung Faserdurchmesser und Kontaktwinkel) und Zugdehnungsmessgerät (Beurteilung der Reißfestigkeit) beurteilt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die zyklisch angeordnete RGD-Sequenz eine signifikant höhere Zelldifferenzierung ($p < 0,016$) gegenüber der linearen Variante bei jedoch gleicher Zellzahl aufweist. Die mittels Emulsion eingebrachten Sequenzen boten keinen signifikanten Vorteil gegenüber der mittels Suspension eingebrachten Fasern ($p > 0,05$). Das Kopplungsverfahren mittels Plasmabehandlung erbrachte eine Tendenz zur vermehrten Osteoinduktivität (Steigerung der Genprodukte aus der RealtimePCR der Alkalischen Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen) gegenüber der unbehandelten PLLA-Faser. Die Fasereigenschaften änderten sich durch die vorgenommenen Einbringungs- oder Kopplungsverfahren nicht signifikant.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass alle aufgeführten Verfahren für die Einbringung der osteoinduktiven RGD-Sequenzen geeignet sind. Die zyklische RGD Variante zeigt sich induktiver als die lineare und steigert die Zelldifferenzierung insbesondere als Oberflächenkontakt nach Plasmabehandlung der Faser.

Ein Nachweisverfahren welches die Quantität der RGD-Sequenzen an der Faseroberfläche darstellen kann, um die osteoinduktive Wirkung zu optimieren und es zu einem möglichen Träger für das Tissue Engineering zu machen, sollte entwickelt werden.

Summary / Abstract

In clinical practice the addressing of bone defects with less availability of the autologous material are major challenges. The Tissue Engineering offers a sufficient method in order to produce bone substitutes. In this case autologous material from the patient is removed, cultured in laboratory conditions (in vitro) and replanted to the human organism.

In previous studies biocompatible scaffolds made of collagen fibre during electrospinning processes were developed and enabled a good approach and differentiation of human mesenchymale stem cells (hMSC). The disadvantage of those Collagen-Scaffolds is a lesser mechanical stability. The results of current research showed that the osteoinductive effect of collagen is due to an amino acid sequence Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD). The aim of this study was to relate the osteoinductive effect of the collagen with the influence of RGD-sequences on mechanical more stable Poly(lactid)Nanofibres (PLLA). For this, the cell culturing of hMSCs was carried out over a period of 22 days under osteoinductive terms and growth conditions.

In this study quantitative determinations of hMSC differentiation markers such as osteocalcin, collagen and alkaline phosphatase over real time PCR and fluorescence microscopy were performed.

We compared a linear and cyclic RGD-sequence with each other and investigated various methods of introducing sequences into the fiber.

The RGD sequences were introduced by suspension and emulsion into the fiber as well as after plasma treatment of the PLLA scaffolds and linking of EDC (1-ethyl-3 (3dimethylaminopropyl) carbodiimide) and NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) to the surface of the fiber.

The structural changes within the fiber characteristics of different procedures were evaluated by electron microscopy (assessment of the fiber diameter and contact angle) and by a tensile testing machine (assessing the tear strength).

In our study we were able to display that the cyclically arranged RGD sequence has significant higher cell differentiation ($p < 0.016$) compared with the linear variation yet same cell number.

The sequences which were introduced by emulsion offered no significant advantage towards the fibers introduced by suspension ($p > 0.05$).

The coupling method using plasma treatment resulted in increased osteoinductivity (increase of gene products from the real time PCR of alkaline phosphatase, osteocalcin and collagen) compared to the PLLA fiber.

Moreover, there were no significant changes within the fiber characteristics by different incorporation and coupling methods.

Taking all aspects into consideration we could show in this study that all performed methods are suitable for the incorporation of osteoinductive RGD sequences.

The cyclic variation of RGD is more inductive than the linear one and increases cell differentiation in particular as a surface contact by plasma treatment of the fiber.

However, it is necessary to find a verification procedure which is able to measure the quantity of the RGD sequences in the fiber surface. So the osteoinductive effect will be optimized and the scaffolds will be a possible medium for tissue engineering.

7 Literaturverzeichnis

Definition der National Foundation, Lake Tahoe, CA 1987

- Ahlmann, E., M. Patzakis, N. Roidis, L. Shepherd & P. Holtom (2002) Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A, 716-20.
- Akdemir, Z. S., H. Akcakaya, M. V. Kahraman, T. Ceyhan, N. Kayaman-Apohan & A. Gungor (2008) Photopolymerized injectable RGD-modified fumarated poly(ethylene glycol) diglycidyl ether hydrogels for cell growth. *Macromol Biosci*, 8, 852-62.
- Baker, S. C., N. Atkin, P. A. Gunning, N. Granville, K. Wilson, D. Wilson & J. Southgate (2006) Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for three-dimensional in vitro biological studies. *Biomaterials*, 27, 3136-46.
- Bosetti, M., L. Fusaro, E. Nicoli, A. Borrone, S. Aprile & M. Cannas (2013) Poly-L-lactide acid-modified scaffolds for osteoinduction and osteoconduction. *J Biomed Mater Res, Part A*, 102A, 3531-3539
- Boudriot, U., R. Dersch, B. Goetz, P. Griss, A. Greiner & J. H. Wendorff (2004) [Electrospun poly-l-lactide nanofibres as scaffolds for tissue engineering]. *Biomed Tech (Berl)*, 49, 242-7.
- Boudriot, U., R. Dersch, A. Greiner & J. H. Wendorff (2006) Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs*, 30, 785-92.
- Bruder, S. P., M. C. Horowitz, J. D. Mosca & S. E. Haynesworth (1997) Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*, 21, 225-35.
- Caplan, A. I. (1994) The mesengenic process. *Clin Plast Surg*, 21, 429-35.
- Choi, W. S., J. W. Bae, H. R. Lim, Y. K. Joung, J. C. Park, I. K. Kwon & K. D. Park (2008) RGD peptide-immobilized electrospun matrix of polyurethane for enhanced endothelial cell affinity. *Biomed Mater*, 3, 044104.
- Chollet, C., C. Chanseau, M. Remy, A. Guignandon, R. Bareille, C. Labrugere, L. Bordenave & M. C. Durrieu (2009) The effect of RGD density on osteoblast and endothelial cell behavior on RGD-grafted polyethylene terephthalate surfaces. *Biomaterials*, 30, 711-20.
- Conget, P. A. & J. J. Minguell (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 181, 67-73.
- Dallari, D., M. Fini, C. Stagni, P. Torricelli, N. Nicoli Aldini, G. Giavaresi, E. Cenni, N. Baldini, A. Cenacchi, A. Bassi, R. Giardino, P. M. Fornasari & A. Giunti (2006) In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res*, 24, 877-88.
- Dallari, D., L. Savarino, C. Stagni, E. Cenni, A. Cenacchi, P. M. Fornasari, U. Albisinni, E. Rimondi, N. Baldini & A. Giunti (2007) Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *J Bone Joint Surg Am*, 89, 2413-20.
- Dennis, J. E., A. Merriam, A. Awadallah, J. U. Yoo, B. Johnstone & A. I. Caplan (1999) A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*, 14, 700-9.
- Dersch, R. 2006. Elektrogesponnene Polymerfasern:Funktionalisierung und Einsatz im Bone Tissue Engineering.

- Do, H., RC. Sadove (1992) The Ilizarov method (callus distraction) in the treatment of open fractures of the tibia. *J Ky Med Assoc.*, 90, 74-7.
- Düwelhenke, N., S. Bierbaum & P. Eysel. 2007. Adhäsion von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten an Hydroxylapatit und zyklisches RGD im Vergleich zu unbeschichtetem Titan. In *gms | Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie*. Berlin.
- Fickert, S., J. Fiedler & R. E. Brenner (2004) Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther*, 6, R422-32.
- Flamans B., J. Pauchot, H. Petite, N. Blanchet, S. Rochet, P. Garbuio, Y. Tropet, L. Obert (2010) Use of the induced membrane technique for the treatment of bone defects in the hand or wrist, in emergency. *Chir. main.*, 29, 307-14
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja & N. N. Kulagina (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4, 267-74.
- Gerlach, K. L. & D. Niehues (2007) Treatment of jaw cysts with a new kind of nanoparticulate hydroxylapatite. *Oral and Maxillofacial Surgery*, 11.
- Giancotti, F. G. & E. Ruoslahti (1999) Integrin signaling. *Science*, 285, 1028-32.
- Greiner, A. & J. H. Wendorff (2007) Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46, 5670-703.
- Groll, J., J. Fiedler, E. Engelhard, T. Ameringer, S. Tugulu, H. A. Klok, R. E. Brenner & M. Moeller (2005) A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 74, 607-17.
- Heineken, F. (1991). "Tissue Engineering: A Brief Overview." *J Biomech Eng*(113): 111
- Hersel, U., C. Dahmen & H. Kessler (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, 24, 4385-415.
- Ho, M. H., L. T. Hou, C. Y. Tu, H. J. Hsieh, J. Y. Lai, W. J. Chen & D. M. Wang (2006) Promotion of cell affinity of porous PLLA scaffolds by immobilization of RGD peptides via plasma treatment. *Macromol Biosci*, 6, 90-8.
- Hou, LT, TI Li, CM Liu, BY Liu, CL Liu, HW Mi (2007) Modulation of osteogenic potential by recombinant human bone morphogenic protein-2 in human periodontal ligament cells: effect of serum, culture medium, and osteoinductive medium. *J Periodontal Res.*, 42, 244-52.
- Hsiong, S. X., T. Boontheekul, N. Huebsch & D. J. Mooney (2009) Cyclic arginine-glycine-aspartate peptides enhance three-dimensional stem cell osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A*, 15, 263-72.
- Hu, J., K. Feng, X. Liu & P. X. Ma (2009) Chondrogenic and osteogenic differentiations of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a nanofibrous scaffold with designed pore network. *Biomaterials*, 30, 5061-7.
- Hu, J., X. Liu & P. X. Ma (2008) Induction of osteoblast differentiation phenotype on poly(L-lactic acid) nanofibrous matrix. *Biomaterials*, 29, 3815-21.
- Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- Höntzsch, D., K. Weise & S. Weller (2000) Conversion from external fixation to internal fixation by medullary nailing in femur and tibia. *Trauma und Berufskrankheit*, 2, 101-110.
- Ibnabddjalil, M., I. H. Loh, C. C. Chu, N. Blumenthal, H. Alexander & D. Turner (1994) Effect of surface plasma treatment on the chemical, physical, morphological, and mechanical properties of totally absorbable bone internal fixation devices. *J Biomed Mater Res*, 28, 289-301.

- Inui, A., T. Kokubu, T. Makino, I. Nagura, N. Toyokawa, R. Sakata, M. Kotera, T. Nishino, H. Fujioka & M. Kurosaka (2009) Potency of double-layered Poly L-lactic Acid scaffold in tissue engineering of tendon tissue. *Int Orthop*.
- Jabbari, E., X. He, M. T. Valarmathi, A. S. Sarvestani & W. Xu (2009) Material properties and bone marrow stromal cells response to in situ crosslinkable RGD-functionlized lactide-co-glycolide scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 89, 124-37.
- Kaufmann, D., A. Fiedler, A. Junger, J. Auernheimer, H. Kessler & R. Weberskirch (2008) Chemical conjugation of linear and cyclic RGD moieties to a recombinant elastin-mimetic polypeptide--a versatile approach towards bioactive protein hydrogels. *Macromol Biosci*, 8, 577-88.
- Kim, H. W., H. S. Yu & H. H. Lee (2008) Nanofibrous matrices of poly(lactic acid) and gelatin polymeric blends for the improvement of cellular responses. *J Biomed Mater Res A*, 87, 25-32.
- Kim, J. Y., G. Z. Jin, I. S. Park, J. N. Kim, S. Y. Chun, E. K. Park, S. Y. Kim, J. Yoo, S. H. Kim, J. W. Rhie & D. W. Cho (2010) Evaluation of SFF-based Scaffolds Seeded with Osteoblasts and HUVECs for Use in Vivo Osteogenesis. *Tissue Eng Part A*.
- Kim, K., Y. K. Luu, C. Chang, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu & M. Hadjiargyrou (2004) Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J Control Release*, 98, 47-56.
- Kim, T. G. & T. G. Park (2006) Biomimicking extracellular matrix: cell adhesive RGD peptide modified electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanofiber mesh. *Tissue Eng*, 12, 221-33.
- Koombhongse, S., W. Liu & D. H. Reneker (2001) Flat polymer ribbons and other shapes by electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 39, 2598-2606.
- Li, C., Q. Zheng, X. Guo, D. Quan & J. Zhao (2009) Combined use of RGD-peptide modified PLGA and TGF-beta1 gene transfected MSCs to improve cell biobehaviors in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 29, 592-8.
- Li, W. J., R. Tuli, C. Okafor, A. Derfoul, K. G. Danielson, D. J. Hall & R. S. Tuan (2005) A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 26, 599-609.
- Liu, Y., L. Cui, F. Guan, Y. Gao, N. E. Hedin, L. Zhu & H. Fong (2007) Crystalline Morphology and Polymorphic Phase Transitions in Electrospun Nylon 6 Nanofibers. *Macromolecules*, 40, 6283-6290.
- Liu, Z., S. Liu, G. Niu, F. Wang & X. Chen (2010) Optical imaging of integrin alphavbeta3 expression with near-infrared fluorescent RGD dimer with tetra(ethylene glycol) linkers. *Mol Imaging*, 9, 21-9.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman & S. L. Gerson (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 176, 57-66.
- Mandal, B. B., S. Das, K. Chaudhury & S. C. Kundu (2010) Implication of silk film RGD availability and surface roughness on cytoskeletal organization and proliferation of primary rat bone marrow cells. *Tissue Eng Part A*.
- Martins, A., E. D. Pinho, S. Faria, I. Pashkuleva, A. P. Marques, R. L. Reis & N. M. Neves (2009) Surface modification of electrospun polycaprolactone nanofiber meshes by plasma treatment to enhance biological performance. *Small*, 5, 1195-206.

- Matthews, J. A., G. E. Wnek, D. G. Simpson & G. L. Bowlin (2002) Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, 3, 232-8.
- Minguell, J. J. (1993) Is hyaluronic acid the "organizer" of the extracellular matrix in marrow stroma? *Exp Hematol*, 21, 7-8.
- Mizuno, M. & Y. Kuboki (2001) Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *J Biochem*, 129, 133-8.
- Naughton, G. K., W. R. Tolbert & T. M. Grillot (1995) Emerging developments in tissue engineering and cell technology. *Tissue Eng*, 1, 211-9.
- Noga, D. E., T. A. Petrie, A. Kumar, M. Weck, A. J. Garcia & D. M. Collard (2008) Synthesis and modification of functional poly(lactide) copolymers: toward biofunctional materials. *Biomacromolecules*, 9, 2056-62.
- Ochman, S., U. Frerichmann, N. Armsen, M. J. Raschke & R. H. Meffert (2006) [Is use of the fixateur externe no longer indicated for the treatment of unstable radial fracture in the elderly?]. *Unfallchirurg*, 109, 1050-7.
- Owen, M. 1985. Lineage of osteogenic cells and their relationship to stromal cells., 1-25. Amsterdam, New York: Elsevier.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig & D. R. Marshak (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- Prabhakaran, M. P., J. Venugopal & S. Ramakrishna (2009) Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 5, 2884-93.
- Ravichandran, R., J. Reddy Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, S. Ramakrishna (2012) Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structure for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage, *Biomaterials*, 33, 846-855
- Rezania, A. & K. E. Healy (2000) The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *J Biomed Mater Res*, 52, 595-600.
- Salasznyk, R. M., W. A. Williams, A. Boskey, A. Batorsky & G. E. Plopper (2004) Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol*, 2004, 24-34.
- Schofer, M. D., U. Boudriot, I. Leifeld, R. I. Sutterlin, M. Rudisile, J. H. Wendorff, A. Greiner, J. R. Paletta & S. Fuchs-Winkelmann (2009a) Characterization of a PLLA-collagen I blend nanofiber scaffold with respect to growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 9, 118-29.
- Schofer, M. D., U. Boudriot, C. Wack, I. Leifeld, C. Grabedunkel, R. Dersch, M. Rudisile, J. H. Wendorff, A. Greiner, J. R. Paletta & S. Fuchs-Winkelmann (2009b) Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers. *J Mater Sci Mater Med*, 20, 767-74.
- Schofer, M. D., S. Fuchs-Winkelmann, C. Grabedunkel, C. Wack, R. Dersch, M. Rudisile, J. H. Wendorff, A. Greiner, J. R. Paletta & U. Boudriot (2008) Influence of poly(L-lactic acid) nanofibers and BMP-2-containing poly(L-lactic acid) nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*, 8, 1269-79.

- Shih, Y. R., C. N. Chen, S. W. Tsai, Y. J. Wang & O. K. Lee (2006) Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells*, 24, 2391-7.
- Sodian, R. & R. Hetzer (2003) SpringerLink - Zeitschriftenbeitrag. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, 18, Number1/Februar 2004, 57-63.
- Song, Y., H. Huang, Q. Zheng & Q. Liao (2009) [Effects of the surface of PLGA-(ASP-PEG) modified with RGD and K16-containing peptide on the adhesion and differentiation of bone marrow stromal cells]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, 26, 1281-5, 1290.
- Sun, H., A. Wirsén & A. C. Albertsson (2004) Electron beam-induced graft polymerization of acrylic acid and immobilization of arginine-glycine-aspartic acid-containing peptide onto nanopatterned polycaprolactone. *Biomacromolecules*, 5, 2275-80.
- Taubenberger, A. V., M. A. Woodruff, H. Bai, D. J. Muller & D. W. Hutmacher (2010) The effect of unlocking RGD-motifs in collagen I on pre-osteoblast adhesion and differentiation. *Biomaterials*, 31, 2827-2835.
- Tsai, W. B., R. P. Chen, K. L. Wei, S. F. Tan & J. Y. Lai (2010) Modulation of RGD-functionalized polyelectrolyte multilayer membranes for promoting osteoblast function. *J Biomater Sci Polym Ed*, 21, 377-94.
- Valizadeh, A., S. Mussa Farkhani (2014) Electrospinning and electrospun nanofibres. *IET Nanobiotechnol.*, 8, 83-92.
- Venugopal, J., L. L. Ma, T. Yong & S. Ramakrishna (2005) In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. *Cell Biol Int*, 29, 861-7.
- Venugopal, J. R., Y. Zhang & S. Ramakrishna (2006) In vitro culture of human dermal fibroblasts on electrospun polycaprolactone collagen nanofibrous membrane. *Artif Organs*, 30, 440-6.
- Wolter, J. R. & R. F. Meyer (1984) Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 82, 187-202.
- Wu, Y. C., T. M. Lee, J. C. Lin, S. Y. Shaw & C. Y. Yang (2010) Argon-plasma-treated chitosan: surface characterization and initial attachment of osteoblasts. *J Biomater Sci Polym Ed*, 21, 563-79.
- Yang, F., C. G. Williams, D. A. Wang, H. Lee, P. N. Manson & J. Elisseeff (2005) The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26, 5991-8.

8 **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Elektrospinnapparatur (Dersch 2006) S.10
- Abb. 2: Signaltransduktion über Integrinrezeptoren im humanen Zellzyklus (Giancotti and Ruoslahti 1999) S.13
- Abb. 3: Lineare RGD-Sequenz für die hier durchgeführten Experimente S.26
- Abb. 4: Zyklische RGD-Sequenz für die hier vorliegenden Experimente S.26
- Abb. 5: Kopplungsschritte der aktivierten PLLA-Nanofaser für die RGD-Sequenz S.28
- Abb. 6: Zellzahl nach 4h Adhäsion auf PLLA, PLLA mit cRGD, PLLA mit LinRGD und Glas S.30
- Abb. 7: hMSC nach 4h Inkubation auf PLLA-Fasern **(a)**, linRGD-haltigen Fasern **(b)** und cRGD-haltigen Fasern **(c)** in 20facher Vergrößerung S.30
- Abb. 8: Kollagen I-Expression auf unterschiedlichen Fasertypen nach 4, 10 und 22 Tagen S.31
- Abb. 9: Signifikant höhere COLI-Immunfluoreszenz pro pixel bei linRGD-haltigen und cRGD-haltigen Scaffolds an Tag 22 S.32
- Abb. 10: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern ohne RGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergrößerung S.32
- Abb. 11: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern mit linRGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergößerung S.33
- Abb. 12: Fluoreszenzaufnahmen von hMSC auf PLLA-Nanofasern mit cRGD-Sequenzen (Zellkerne: blau, Kollagen: rot) in 20facher Vergrößerung S.33
- Abb. 13: Fasercharakterisierung mittels SEM von PLLA **(a)** und cRGD-Inkorporation als Suspension PLLA-cRGD (s) **(b)** und Emulsion PLLA-cRGD (d) **(c)** S.35

- Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der FITC-gekoppelten cRGD-Sequenzen: **(a)** PLLA-cRGD (s), **(b)** PLLA-cRGD (d) in 63facher Vergrößerung S.36
- Abb. 15: Hydrophilieeigenschaften der PLLA-Fasern als Angabe des Wasserkontaktwinkels S.36
- Abb. 16: Einfluss der cRGD-Sequenzen auf Adhäsion der hMSC nach 4h. Signifikanter Anstieg der Zellzahl bei PLLA-cRGD (d)-Fasern. S.37
- Abb. 17: Proliferationsmessung anhand von Ki67-Immunfluoreszenzfärbung nach 4 Tagen Kultivierung. S.38
- Abb.18: Zellzahl am Tag 22 auf PLLA, cRGD (d)- und cRGD (s)-haltigen Fasern S.38
- Abb. 19: Einfluss von cRGD-Sequenzen auf die Genexpression und Produktion von COLI und OC von hMSC. Genexpression von COLI **(a)** und OC **(b)** im Zeitverlauf auf PLLA-, PLLA-cRGD (d)- und PLLA-cRGD (s)-Nanofasern. Quantitative Bestimmung von COLI und OC auf PLLA, PLLA-cRGD (d) und PLLA-cRGD (s) bis zum Versuchsende an Tag 22 **(c)** S.39
- Abb. 20: hMSC auf PLLA-Nanofasern an Tag 22 nach COLI- (rot) und OC-Immunfluoreszenzfärbung (grün): **(a)** PLLA-Fasern mit cRGD(s), **(b)** PLLA-Fasern mit cRGD(d) in 20facher Vergrößerung S.40
- Abb. 21: Einfluss der Plasmabehandlung auf die PLLA-Nanofaser: **a)** PLLA-Faser ohne Plasmabehandlung, **b)** PLLA-Faser nach 5 min Plasmabehandlung S.41
- Abb. 22: Kontaktwinkelabnahme im Zeitverlauf der Plasmabehandlung S.42
- Abb. 23: Signifikante Abnahme der möglichen Maximalbelastung der Faser nach 2 minütiger und 5 minütiger Plasmabehandlung S.42
- Abb. 24: Elastizität der Fasern nach 2 minütiger und 5 minütiger Plasmabehandlung S.43
- Abb. 25: Keine signifikante Veränderung des Faserdurchmessers nach Plasmabehandlung S.43
- Abb. 26: Quantitative Fluoreszenzmessung der PLLA Fasern in der Kontrollgruppe, plasmabehandelten Fasern mit EDC,

- plasmabehnadelten Fasern mit NHS und plasmabehandelten Fasern mit EDC+NHS S.44
- Abb. 27: Darstellung der Fasern unter Fluoreszenzlicht mit FITC-gekoppelten cRGD-Sequenzen: Plasmabehandelte Fasern **(a)**, plasmabehandelte Fasern mit EDC **(b)**, plasmabehandelte Fasern mit NHS **(c)** und plasmabehandelte Fasern mit EDC+NHS **(d)** in 20facher Vergrößerung S.45
- Abb. 28: Konfokalmikroskopie der plasmabehandelten PLLA-Fasern mit EDC und NHS Behandlung sowie cRGD-Kopplung S.45
- Abb. 29: Proliferation von hMSC auf PLLA-, plasmabehandelten, und cRGD-Fasern unter Wachstumsbedingungen und osteoinduktiven Bedingungen S.46
- Abb. 30: Zellzahlen auf unterschiedlichen Scaffolds an Tag 4 und 22 unter Wachstumsbedingungen **(a)** und osteoinduktiven Bedingungen **(b)** S.47
- Abb. 31: Einfluss von Plasmabehandlung und cRGD-Kopplung auf PLLA-Nanofasern auf die Genexpression unter Wachstumsbedingungen: Alkalische Phosphatase (AP) **(a)**, KollagenI (COLI) **(b)** und Osteocalcin (OC) **(c)** jeweils an Tag 4, 10 und 22 des Versuches S.49
- Abb. 32: Einfluss von Plasmabehandlung und cRGD-Kopplung auf PLLA-Nanofasern auf die Genexpression unter osteoinduktiven Bedingungen: Alkalische Phosphatase (AP) an Tag 4, 10 und 22 des Versuches **(a)**, KollagenI (COLI) im Zeitverlauf **(b)** und Osteocalcin (OC) im Zeitverlauf **(c)** S.51

9 Anhang

Patienteninformation

Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten Sie um die Teilnahme an der o. g. Untersuchung bitten.

Wie Sie vielleicht wissen, gewinnt der Ersatz von zerstörtem Knochen mittels Bone Tissue Engineering (Verwendung von Knochenersatzmaterialien) zunehmend an Bedeutung. Eine wesentliche Voraussetzung für die Herstellung von biologischen Regeneraten ist der Einsatz eines geeigneten Trägermaterials. Hier bietet der Einsatz von elektrogesponnenen Nanofasern eine interessante Perspektive. Diese werden mit menschlichen Stammzellen besiedelt und untersucht.

Die Stammzellen leben als „Knochenmark“ in den Hohlräumen zwischen Knochenbälkchen aller großen Knochen des Menschen. Bei einer Hüftoperation mit prothetischem Hüftersatz wird ein wenig Knochensubstanz aus dem Oberschenkelknochen entfernt, um den Prothesenschaft einbringen zu können. Dieses Knochenmark wird im Allgemeinen, genau wie der entfernte Hüftkopf selbst, verworfen.

Wir möchten Sie bitten, uns ein wenig Millimeter großes Fragment von dem bei der Hüftoperation entfernten Knochen aus dem Oberschenkelschaft oder Hüftkopf zur Verfügung zu stellen, um damit Untersuchungen an gesunden Stammzellen durchführen zu können.

Das Knochenmarksfragment erhält beim Eintreffen im Labor eine Probennummer, der Ihr Name, ihr Alter und das Eingangsdatum

zugeordnet ist. Alle weiteren Untersuchungen werden anhand der anonymisierten Probennummer durchgeführt.

Durch Ihre Teilnahme an dem Studienprojekt wird ein besseres Verständnis biologischer Interaktion, zwischen Stammzellen und verwendetem Trägermaterial, erzielt. Sie können über Ihre Teilnahme an der Untersuchung selbstverständlich frei entscheiden und Ihre Einwilligung jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen bzw. zurückziehen. Im Falle einer Ablehnung werden Ihnen bezüglich Ihrer weiteren Behandlung natürlich keine Nachteile entstehen.

Einwilligungserklärung

Untersuchung von Stammzellen auf Knochenersatzmaterialien

Ich, bin über die Bedeutung und Tragweite der o. g. Studie aufgeklärt worden und habe die Patienteninformation gelesen und verstanden. Alle Fragen zu dieser vorgesehenen Studie wurden von Herrn/Frau Dr. med. zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich hatte genügend Zeit für meine Entscheidung und bin bereit, ein bei der Operation anfallendes Knochenfragment für die Untersuchung von Stammzellen zur Verfügung zu stellen. Ich bin mit der im Rahmen der Studie erforderlichen Aufzeichnung von Krankheitsdaten entsprechend der Patienteninformation einverstanden.

Ich weiß, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.

Eine Ausfertigung des Aufklärungs-/Informationsblatts und der Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Marburg, den


.....

(Unterschrift des Patienten)

.....

(Unterschrift des Arztes)

Ethikvotum

	Philipps Universität Marburg
---	--

<p>Philipps-Universität - 35032 Marburg</p> <p>Herrn Dr. M. Schofer Universitätsklinikum Giessen u. Marburg GmbH Standort Marburg Klinik für Orthopädie und Rheumatologie</p> <p>- im Hause -</p>	<p>Fachbereich Medizin Dekanat/Ethikkommission</p> <p>Prof. Dr. med. Gerd Richter (Vors.) PD Dr. med. Tanja Krones</p> <p>Tel.: 06421 286 6487 Fax: 06421 286 6585 Sek.: D. Raiss E-Mail: ethikkom@post.med.uni-marburg.de Anschrift: Baldingerstrasse/Postfach 2360 35032 Marburg Web: www.med.uni-marburg.de/ethikkom Az.: 30/06</p>
---	---

Marburg, den 26.03.2008

Nachr.: KKS Marburg

Ihre Studie: „Humane mesenchymale Stammzellen als in vitro Zellkulturmodell unter besonderer Berücksichtigung der Biokompatibilitätsprüfung von elektrogesponnenen Nanofasern als Matrix für Tissue Engineering“.

Eingereichte Unterlagen:

1. Ethikantrag,
2. Patienteninformation,
3. Einwilligungserklärung,
4. Bescheinigung über Hauptprüferwechsel.

Sehr geehrter Herr Dr. Schofer,

vielen Dank für die Stellungnahme zur o. g. Studie zu unserem Gutachten vom 24.03.2006. Darüber hinaus wird jetzt ein Wechsel des Hauptprüfers vorgenommen. Hinsichtlich der in unserem Gutachten aufgeworfenen Fragen können diese als getätigt angesehen werden, gegen den Wechsel des Hauptprüfers erhebt die Ethikkommission keinen Einspruch.

Damit schließt die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg ihr Gutachten mit einem positiven Ethikkommissionsvotum ab.

Damit schließt die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg ihr Gutachten mit einem positiven Ethikkommissionsvotum ab.

Entsprechend der ausschließlich beratenden Funktion der Ethik-Kommission betrifft dieses Votum nur die ethische Beurteilung der Konzeption, der vorgesehenen Methoden, der Durchführung und Überwachung des betreffenden Projektes sowie der beabsichtigten Patientenaufklärung. Die ärztliche und juristische Verantwortung verbleibt jedoch uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Bitte geben Sie uns jede Änderung in der Protokolldurchführung bekannt. Es muss dann geklärt werden, ob das Votum der Ethik-Kommission noch Gültigkeit hat.

Sekretariat : Frau Raiss, Montag – Donnerstag 8 – 12 Uhr, Freitag 8 – 11 Uhr

Kommissionsmitglieder: ☐ Prof. Dr. med. R. Berger, ☐ Prof. Dr. jur. G. Freund,, ☐ Ref. jur. Philipp Georgy, ☐ Prof. Monika Böhm, ☐ Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, ☐ Prof. Dr. M. Koch, ☐ Prof. Dr.med. Czubayko, ☐ Prof. Dr. med. G. Richter (Vorsitzender), ☐ Dr. med. Dipl. Soz. Tanja Krones (Geschäftsführung) ☐ cand. med. Christoph Paul ☐ Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer, ☐ Prof. Dr. med. Uwe Wagner (stellver-retender Vorsitzender), ☐ Prof. Dr. med. R. Maier, ☐ Prof. Dr. med. N. Donner-Banzhoff, ☐ PD Dr. H.-H. Müller, ☐ Prof. Dr. med. A. Neubauer, ☐ Dr. B. Tackenberg, ☐ Bettina Nieth, ☐ Dr. Thomas Neubert.

Publikationen

RGD-functionalisation of PLLA nanofibers by surface coupling using plasma treatment: influence on stem cell differentiation.

Paletta JR, Bockelmann S, Walz A, Theisen C, Wendorff JH, Greiner A, Fuchs-Winkelmann S, Schofer MD.

J Mater Sci Mater Med. 2010 Apr;21(4):1363-9. doi: 10.1007/s10856-009-3947-2. Epub 2009 Nov 27.

Effect of direct RGD incorporation in PLLA nanofibers on growth and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.

Schofer MD, Boudriot U, Bockelmann S, Walz A, Wendorff JH, Greiner A, Paletta JR, Fuchs-Winkelmann S.

J Mater Sci Mater Med. 2009 Jul;20(7):1535-40. doi: 10.1007/s10856-009-3719-z. Epub 2009 Mar 1.

Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Berger, Czubayko, Dabrock, Daut, Eilers, Feuser, Fuch-Winkelmann, Gerdes, Gress, Grzeschik, Grundmann, Gudermann, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Höffgen, Hofmann, Hoyer, Jungclas, Kann, Klose, Klenk, Koolman, Krieg, Kroll, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Martin, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Renz, Richter, Riße, Röhm, Röper, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schofer, Schrader, Steininger, Stiletto, Tibesku, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Westermann, Werner, Wulf, Zovko

Danksagung

Für die Anfertigung dieser Dissertation danke ich mehreren Personen herzlichst.

Frau Prof. Fuchs-Winkelmann und Herrn Prof. Dr. Markus Schofer danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Klinik für Orthopädie der Philippsuniversität Marburg sowie die Unterstützung auch im Rahmen von Materialien und Räumlichkeiten.

Dem Fachbereich Chemie der Philippsuniversität Marburg insbesondere Herrn Prof. Dr. J.H. Wendorff und Dr. Andreas Walz für die gute Kooperation der gemeinsamen Arbeit.

Den Patienten der Abteilung für Orthopädie welche mit der Zustimmung zur Knochenspende die experimentelle Arbeit erst ermöglicht haben.

Frau Eleni Archontidou-Aprin für den herzlichen Einsatz im Labor und die helfende Hand.

Meiner Mitdoktorandin Irini Leifeld für geteiltes Leid und so manche ergebnisreiche Stunde zu unmenschlichen Zeiten im Labor sowie Frau Dr. Anne Veltum für die nachfolgende Hilfe und Freundschaft.

Meinen Freundinnen Birthe Kranen und Kathrin Schaper fürs Zuhören, Mitleiden, Mitfreuen, Mitmachen und jeden Beitrag zur Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Marcel Dudda für die wissenschaftliche Unterstützung und die guten Ratschläge.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Eltern Sabine und Manfred Bockelmann die mir nicht nur das Studium sondern auch diese Arbeit ermöglicht haben und stets an mich glauben.

